Vergleichende Untersuchungen über die Eiweißzusammensetzung und den Trigonellingehalt verschiedener Rohkaffees im Hinblick auf die Aromabildung

von

RICHARD GAIGL

1964

Vergleichende Untersuchungen über die Eiweißzusammensetzung und den Trigonellingehalt verschiedener Rohkaffees im Hinblick auf die Aromabildung

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

P. UNIV. BIBLIOTHEK LEIDEN

vorgelegt

von

Richard Gaigl

aus

Waldkirch/Breisgau

1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. H. Thaler
2. Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 11. 61

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Die vorliegende Arbeit wurde an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München in der Zeit von Mai 1958 bis April 1961 durchgeführt.

Die Anregung hierzu erhielt ich von Herrn Prof. Dr. H. T h a l e r , dem ich für die stetige Förderung und Anteilnahme an dieser Arbeit sehr herzlich danken möchte.

Dem Direktor der Deutschen Forschungsanstalt Herrn Prof. Dr. S. W. S o u c i danke ich besonders für sein wohlwollendes Interesse und die großzügig gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Unterstützung dieser Arbeit gleichfalls sehr zu Dank verpflichtet.

Für erhaltene Hinweise und Beratung möchte ich aber auch meinen Dank aussprechen Herrn Dr. Dr. K. D r e p p e r vom Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere, München und Herrn Dr. K. H a n n i g vom Max Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555212_0066

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einführung	1
B.	Die Untersuchungen an Rohkaffee	4
I.	Die Auswahl der Proben	4
II.	Der Gehalt der Kaffeemuster an Eiweiß, Coffein und Trigonellin	7
III.	Die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Kaffee-Eiweisses	10
	1. Qualitative Voruntersuchung	10
	2. Die quantitative Zusammensetzung des Kaffee-Eiweisses	11
	3. Vergleich der Eiweißzusammensetzung bei den verschiedenen Kaffeeproben	14
IV.	Vergleich der eigenen Untersuchungsergebnisse mit denjenigen von Underwood und Deatherage	16
V.	Zusammenhänge zwischen den Stickstoffsubstanzen und dem Aroma von Kaffee	19
C.	Untersuchungsmethodik	22
I.	Vorbereitung des Untersuchungsmaterials und die neben der Eiweißanalyse durchgeführten Bestimmungen	22
II.	Die Eiweißanalyse	23
	1. Die Hydrolyse des Eiweisses	23
	2. Die Trennung der Aminosäuren	25
	3. Quantitative Bestimmung der Aminosäuren	29
	4. Testanalysen	32
	5. Die Bestimmung des Cystins	33
	6. Die Bestimmung des Tryptophans	37
D.	Zusammenfassung	39
E.	Literaturverzeichnis	41
Anhang		I - VIII

A. Einführung

Im 15. Jahrhundert wurde in Arabien ein Getränk bekannt, das wohl von Anfang an die Menschen durch seinen Wohlgeschmack und seine Wirkung faszinierte: Der Kaffee.
In den folgenden 2 Jahrhunderten breitete sich dieser über die Türkei nach Europa aus und eroberte sich von da aus die Welt. Heute gibt es einen Weltkonsum gewaltigen Ausmaßes.

Hand in Hand mit dieser Entwicklung dehnte sich der Anbau der Kaffeepflanze schon im 18. Jahrhundert bis nach Ostasien und Mittelamerika aus und wird jetzt nahezu überall dort betrieben, wo die klimatischen Bedingungen es erlauben.

In der Kultivierung steht von den zahlreichen Arten der Gattung Coffea die Art Coffea arabica klar im Vordergrund. Daneben haben noch Coffea robusta und Coffea liberica größere Bedeutung erlangt. Von allen diesen Arten gibt es eine größere Anzahl von Unterarten (Varietäten), die sich durch Züchtung, Mutation und klimatische Anpassung herausentwickelt haben.

Im Laufe der Zeit bemerkte man, daß allen diesen Sorten Unterschiede in Qualität und Charakter des daraus bereiteten Kaffeegetränkes entsprachen. Man begann deshalb auf Varietät und Herkunft zu achten, die so zum wichtigen Signum des Handels wurden.

Dabei stellte man fest, daß die Qualität eines Kaffees im wesentlichen von der Gegend abhängt, in der er gewachsen ist und nur in geringerem Ausmaß von der Kaffeesorte selbst. Man hat also nicht wie bei anderen Kulturpflanzen, etwa wie beim Weinstock, Spielarten mit einem ausgeprägten Sortenbouquet, das zwar beim Anbau in verschiedenen Gegenden gewisse Änderungen erfährt, seine charakteristischen Grundzüge aber unverändert beibehält. Während also - um beim Beispiel des Weinstocks zu bleiben - der Wein aus einer Muskatellerrebe, gleich ob sie in der Pfalz, in Piemont oder auf der Insel Samos gewachsen ist, stets das bezeichnende "Muskatellerbouquet" aufweist, ändern sich die Aromaeigenschaften einer Kaffeesorte mit der Gegend des Anbaus. In einem Landstrich, der für die

Erzeugung mehr oder weniger mittelmäßiger Kaffeequalitäten bekannt ist, liefert nach den bisherigen Erfahrungen keine Kaffee-Art oder -Varietät ein erstklassiges Produkt.

Die Natur der Qualitätsunterschiede zu ergründen, ist nun Sache der Wissenschaft. Man möchte fragen, wo die Ursachen des besonderen Kaffeearomas und Kaffeegeschmackes und diejenigen der Nuancen bei den verschiedenen Sorten liegen.

Daß die Aroma- und Geschmacksstoffe sich zum weitaus größten Teil erst beim Röstprozeß bilden, ist offensichtlich. Es liegt aber nahe anzunehmen, und diese Vermutung ist von verschiedenen Autoren auch ausgesprochen worden, daß die oft sehr starken Unterschiede im Aroma der einzelnen Kaffees auf Verschiedenheiten in der Zusammensetzung des Rohmaterials zurückgehen. Insbesondere kann man annehmen, daß einerseits das Eiweiß, andererseits das Trigonellin das Aroma des Kaffees in der einen oder anderen Richtung beeinflußt.

So haben die Untersuchungen von H u g h e s und S m i t h (1) gezeigt, daß die Bildung von Pyridin der Zersetzung von Trigonellin parallel läuft. Bei der überaus komplizierten Natur des Aromas des gerösteten Kaffees ist damit natürlich nicht gesagt, daß trigonellinreiche Kaffeesorten unbedingt dem Typ des "harten" Kaffees angehören müssen, für den die eigenartige Pyridinkomponente des Aromas charakteristisch ist.

Was das Eiweiß anlangt, so hat B a r b e r a (2) sich dahingehend geäußert, daß das von ihm als Bestandteil der Proteine der grünen Kaffeebohne nachgewiesene Prolin für die Bildung des von B e r n h e i m e r (3) schon 1880 unter den flüchtigen Stoffen des gerösteten Kaffees aufgefundenen Pyrrols verantwortlich ist. Ebenso vermutet B a r b e r a , daß die von ihm im Kaffee-Eiweiß ebenfalls nachgewiesenen Aminosäuren Cystin und Methionin - oder wenigstens eine von ihnen - die Quelle für den Schwefelwasserstoff und das Methylmerkaptan darstellen, die längst als Bestandteile des Kaffeearomas bekannt sind.

Neben solchen Aminosäuren, die wie die eben genannten, stark riechende Zersetzungsprodukte liefern können, dürften aber auch manche andere befähigt sein, durch Umsetzung z.B. mit Kohlenhydraten Aromastoffe zu liefern, Von R o t h e

und T h o m a s (4), die sich mit dem Brotaroma befaßt haben, wurde vor kurzem gezeigt, daß beim Erhitzen von Xylose mit Aminosäuren Furfurol und der aus der betreffenden Aminosäure durch Decarboxylierung und Desaminierung sich ableitende Aldehyd entsteht. Nun sind Aldehyde verschiedenster Art als Bestandteile des Kaffeearomas bekannt. Sie vermögen auch infolge ihres oft in außerordentlich geringer Menge noch sehr deutlich wahrnehmbaren Geruchs einen starken Einfluß auf das Aroma auszuüben. Es sei in diesem Zusammenhang nur darauf hingewiesen, daß der beim Stehen von Milch in hellem Tageslicht innerhalb kurzer Zeit auftretende recht unangenehme "Lichtgeschmack" seine Ursache in dem unter dem Einfluß der Bestrahlung aus Methionin in winzigsten Mengen entstehenden Methional hat.

Es erscheint deshalb sehr wohl möglich, daß nicht nur ein wechselnder Gehalt der Kaffeeproteine an Prolin, Cystin und Methionin, sondern auch an verschiedenen anderen Aminosäuren von Einfluß auf das Aroma der verschiedenen Kaffeesorten ist. Da über die quantitative Zusammensetzung dieser Proteine bis heute nur sehr wenig bekannt ist - es liegt bisher nur eine einzige Untersuchung von U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e (5) an einem einzigen Santoskaffee aus dem Jahre 1952 vor - so sollte die Zusammensetzung des Eiweißes einer Anzahl von Rohkaffeeproben verschiedener, möglichst genau bekannter Herkunft zum Zwecke des Vergleichs untersucht werden. Über die Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

B. Die Untersuchungen an Rohkaffee.

I. Die Auswahl der Proben.

In der Einführung wurde bereits betont, daß die Unterschiede in der Qualität nicht so sehr eine Eigentümlichkeit der botanischen Art und Varietät, als vielmehr der Landschaft sind, in welcher der Kaffee wächst.

In Brasilien werden heute vorwiegend 2 Arabicavarietäten gebaut, von denen die Sorte "Café nacional" den weitaus größten Teil, die Sorte "Bourbon" etwa 20 % der Gesamternte liefert. Der Rest der Produktion verteilt sich auf "Café commun", "Maragogype" und andere. Diese Sorten liefern in den Staaten Minas Geraes und Rio de Janeiro überwiegend ausgesprochen "harte" Kaffees, den sogenannten Typ Rio, in den Staaten Santos und Paraná dagegen "weiche", in Bahia schließlich typisch "neutrale" Kaffees. Die Unterschiede in Aroma und Geschmack der drei Typen "hart", "weich" und "neutral" sind sehr groß, trotzdem diese von den gleichen Zuchtvarietäten von Coffea arabica geliefert werden. Der feinere chemische Aufbau der Kaffeesamen scheint demnach nicht nur genetisch bedingt, sondern auch der Ausdruck geographischer, dh. klimatischer und geologischer Einflüsse zu sein, wie schon eingangs erwähnt wurde.

Für die geplante Untersuchung der Zusammensetzung des Kaffeeproteins war es daher unbedingt erforderlich, die Herkunft und die Anbauverhältnisse der betreffenden Proben möglichst genau zu kennen.

Es wurde deshalb veranlaßt, daß den gelieferten Kaffeemustern jeweils "Steckbriefe" beigefügt wurden, aus denen die genauen Sortenbezeichnungen, die Herkunft und außerdem auch möglichst eingehende Angaben über die Anbauverhältnisse und die Klimalage im Anbaugebiet zu ersehen waren.

Von den zahlreichen Proben wurden acht zur Untersuchung ausgewählt. Diese gliedern sich in:

5 brasilianische Kaffees der Art Coffea arabica,
2 ostafrikanische Kaffees der Art Coffea robusta,
1 westafrikanischen Kaffee der Art Coffea liberica.

Die nähere Kennzeichnung der Proben zeigt Tabelle 1.
Von den fünf brasilianischen Kaffees stammen vier aus der Provinz Minas Geraes, wo sie vermutlich auf ähnlichem geologischem Untergrund gewachsen sind. Drei der Proben sind vom Typ "Rio" und sind also "harte" Kaffees, die geröstet einen deutlich phenolischen und an Pyridin erinnernden Geruch aufweisen. Alle drei gehören der Sorte "Café nacional" an. Die Probe 5, die ebenfalls aus Minas Geraes stammt, ist ein "Café commun". Ob Probe 4 "Bourbon" auch aus Minas Geraes stammt, konnte nicht sicher festgestellt werden.

Mit Ausnahme der Probe 5 scheinen die brasilianischen Kaffees alle auf keinem besonders guten Boden gewachsen zu sein. Bei dem geringen Humusgehalt der Böden ist Stickstoffmangel nicht ausgeschlossen, weshalb in den betreffenden Pflanzungen Stickstoffdüngung verschiedener Art angewendet wird. Besonders ungünstige Verhältnisse scheinen in der Plantage zu herrschen, von welcher die Probe 4 "Bourbon" stammt. Der vulkanische Untergrund deutet zwar auf eine gute Versorgung mit Mineralstoffen und Spurenelementen hin, der Boden ist aber sehr humusarm und eine Düngung findet erst seit 5 Jahren statt. Außerdem ist die Pflanzung offensichtlich sehr alt.

Im Gegensatz dazu ist die Probe 5 "Commun" auf humusreichem Boden, der noch dazu mit Stickstoff gedüngt wird, gewachsen. Auch die übrigen Bedingungen sind bei dieser letzten Sorte etwas andere als bei den vier restlichen Brasilkaffees. Die Pflanzung liegt 1 000 m ü.d.M. und die Niederschlagsmenge beträgt im Jahr etwa 1 000 mm. Die vier übrigen Brasilkaffees sind dagegen zwischen 600 - 750 m ü.d.M. gewachsen und die Niederschlagsmengen liegen nur bei der Probe 2 bei 1 042 mm, bei den anderen zwischen 1 200 und 1 500 mm. Der Ernteertrag ist bei Probe 1, 2 und 3 relativ gering. Bei den beiden anderen kann er als verhältnismäßig gut bezeichnet werden.

Die beiden Robustakaffees gehören der Sorte "Uganda" an. Die Bodenverhältnisse sind recht verschieden. Während die eine Pflanzung (Probe 6) auf rotem lateritisiertem Lehm mit hohem Tongehalt in fast 1 200 m Höhe liegt, befindet sich die andere auf sandigem, nicht lateritisiertem Lehm 1 000 m ü.d.M. Die Niederschlagsmengen unterscheiden sich mit 1 130 mm und 1 390 mm im Jahr nicht allzu sehr. Der verschiedene Boden wirkt sich offenbar aber sehr stark auf den Ertrag der Pflanzungen aus. Während diejenige, von der die Probe 6 stammt, 1 260 kg/ha erbrachte, lieferte die andere sehr wechselnde Erträge, nämlich 530 bis 900 kg/ha.

Das Muster von Libericakaffee kommt von der Insel Fernando Poo und dürfte aus verschiedenen Pflanzungen stammen, die zum Teil bis zu 900 m ü.d.M. liegen. Die Verhältnisse unter denen diese Pflanzungen arbeiten, sind reichlich schlecht. Nicht nur, daß der Boden humusarm und wenig tiefgründig ist, die Bäume leiden noch dazu unter einem Schädlingsbefall (Fusarium xylaroides). Trotzdem kann - wie aus dem die Probe begleitenden Bericht hervorgeht, - unter den geschilderten Bedingungen der Ertrag von 400 - 450 kg/ha als befriedigend angesehen werden, obwohl normale gesunde Pflanzungen von Libericakaffee 700 - 900 kg/ha, einige wenige bis zu 3 000 kg/ha ergeben (6).

II. Der Gehalt der Kaffeemuster an Eiweiß, Coffein und Trigonellin.

Neben dem Eiweiß sind nach den bisherigen Kenntnissen Coffein und Trigonellin die Hauptstickstoffträger in der Kaffeebohne. Die Ermittlung dieser beiden letzten Substanzen gibt somit zusammen mit den Aminosäurenbestimmungen die Möglichkeit, eine Gesamtstickstoffbilanz im Kaffee aufzustellen, wobei die Summe von Aminosäuren-, Coffein- und Trigonellinstickstoff mit einer gleichzeitig durchgeführten Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verglichen werden kann. Eventuelle, über die Fehlergrenzen der Methodik hinausgehende Differenzen wären dabei als ein Beweis für die Anwesenheit von irgendwelchen, bisher noch nicht näher bekannten stickstoffhaltigen Substanzen

Tabelle 1: Charakteristik der Untersuchungsproben

Kennzeichn. der Probe	Sorte	Herkunftsland	Genauere Herkunftsbezeichnung	Erntejahr	Ernteertrag +)	Höhe ü.d.M.	Mittlere Jahrestemperatur	Mittlere jährl. Niederschlagsmenge	Bodenverhältnisse
Probe 1 Nacional I	Coffea arabica Rio	Brasilien	Prov. Minas Geraes Municipio de Guaci Fazenda Sao Domingos	1959/60	480 kg/ha	600 m	18°C	1415 mm (1959)	Tiefgründiger, aber humusarmer Boden über Sedimentgestein; seit 3 Jahren Stickstoffdüngung
Probe 2 Nacional II	Coffea arabica Rio	Brasilien	Prov. Minas Geraes Municipio de Markumirim, Zona da Mata, Fazenda Alair Jose Dias	1959/60	390 kg/ha	700 m	19°C	1042 mm (1959)	Tiefgründiger, aber humusarmer Boden über Sedimentgestein; Düngung mit Stallmist u. dem Rückstand der Kaffeekirschen
Probe 3 Nacional III	Coffea arabica Rio	Brasilien	Prov. Minas Geraes Municipio de Carnopolis e Claudio Fazenda cedro	1959/60	480 kg/ha	750 m	28°C	1500 mm	Humusarmer Boden über Sedimentgestein. Düngung mit dem Rückstand der Kaffeekirschen
Probe 4 Bourbon	Coffea arabica Bourbon	Brasilien	Municipio de Sales de Oliveira Fazenda Lageado	1959/60	540 kg/ha	615 m	23°C	1190 mm	70 Jahre alte Pflanzg. über vulkan. Gestein, sehr humusarm; seit 5 Jahren Düngung mit Stallmist.
Probe 5 Commun	Coffea arabica Commun	Brasilien	Prov. Minas Geraes Municipio de campestre e Botelhos Fazenda Cachoeira	1959/60	540 kg/ha	1000 m	20°C	1000 mm	Humusreicher Boden über Sedimentgestein. Stickstoffdüngung wird angewendet.
Probe 6 Robusta I	Coffea robusta Uganda	Uganda	Mengo District Kawanda Experiment. Station	1960	1260 kg/ha	1195 m	20,5°C	1130 mm	Roter, lateritisierter Lehm mit hohem Tongehalt Untergrund: Präkambrische metamorphe Gneise, Schiefer und Quarzite
Probe 7 Robusta II	Coffea robusta Uganda	Uganda	Abhänge des Ruwenzori-Gebirges, Semlicki-Tal	1960	530-900 kg/ha	1000 m	21,1°C	1390 mm	Sandiger, nicht lateritisierter Lehm Untergrund: Schuttmaterial vom Ruwenzori, überlagert und gemischt mit Schlamm vom Semlickifluß.
Probe 8 Liberica	Coffea liberica	Westafrika, Insel Fernando Poo		1960	400-450 kg/ha	0-900 m (Hauptprod. unter 500 m)	24°C	2000 mm	Wenig tiefgründiger und humusarmer Boden über vulkanischem Gestein, Stickstoffdüngung wird angewandt. Anmerkung: Viele Bäume wurden von dem Schwamm Fusarium xylaroides angegriffen.

+) Bei Angabe des Ernteertrages handelt es sich um handelsfertigen Rohkaffee.

zu werten.

Aus den Bilanzen.wie sie in Tabelle I - VIII im Anhang niedergelegt sind, ergab sich aber, daß außer den erwähnten Verbindungen keine nennenswerten Mengen anderer Stickstoff-Substanzen vorhanden sein können.

Die Bestimmung von Coffein und Trigonellin wurde nach der papierchromatographischen Methode von K o g a n , D i C a r l o und M a y n a r d (7) zusammen durchgeführt. Die in Abb. 1 und in den Tabellen I - VIII im Anhang angeführten Analysenergebnisse stellen Mittelwerte aus mindestens 2 Parallelbestimmungen dar. Der Eiweißgehalt wurde aus der Summe des Stickstoffs der Aminosäuren durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 errechnet.

Vergleicht man den Eiweißgehalt der einzelnen Proben untereinander, so ergibt sich eine erstaunliche Gleichförmigkeit nicht nur zwischen den einzelnen Zuchtvarietäten von Coffea arabica, sondern auch zwischen den drei Coffea-Arten Arabica, Robusta und Liberica. Wenn auch die Probe "Bourbon" mit 8,71 % den niedrigsten Eiweißgehalt aufweist, so liegt der höchste Proteingehalt, derjenige der Probe "Robusta II", bei 9,70 %. Wenn man sich dagegen den Eiweißgehalt der verschiedenen Weizenarten und -sorten vergegenwärtigt, der zwischen 5 und 18 % liegt, also um rund 350 % des niedrigsten Wertes schwankt, so muß derjenige der in Rede stehenden Kaffeeproben als nahezu konstant bezeichnet werden.
Es erscheint dies vor allen Dingen im Hinblick auf die Angaben des Schrifttums von Interesse. So findet sich in der im allgemeinen recht guten Zusammenfassung von L o c k h a r t (8) die Angabe, daß Rohkaffee 9 - 16 % Protein enthalten soll. Dazu muß allerdings gesagt werden, daß es sich in diesem Falle um Eiweißwerte handelt, die aus dem Gesamtstickstoff errechnet wurden und bei denen bestenfalls der Coffeinstickstoff ermittelt und abgezogen worden ist. Der Trigonellinstickstoff scheint bei solchen Untersuchungen bisher überhaupt nur von H a d o r n und S u t e r (9) berücksichtigt worden zu sein, die bei einer Probe von Arabica Santos 10,25 %, bei einem Kongo Robusta 11,29 % Protein fanden. Diese Autoren bestimmten den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und errechneten den Proteingehalt nach Abzug des Coffein- und Trigonellin-

stickstoffs.

Im Gegensatz zum Eiweiß treten jedoch beim Coffein und Trigonellin die Artunterschiede deutlich hervor.

Den hohen Coffeinwerten bei den Robustaproben von 1,55 - 1,60 % stehen solche von etwa 1 % bei den Arabicasorten gegenüber. In der Mitte liegt Coffea liberica mit 1,21 % Coffein. Diese Werte stehen mit den Angaben des Schrifttums im Einklang, wonach Robustakaffees als verhältnismäßig coffeinreich gelten.

Anders ist die Verteilung des Trigonellins. Den höchsten Trigonellingehalt zeigen die fünf Arabicas mit 1,0 - 1,2 %. Danach folgen die Robustas mit 0,6 - 0,7 %. Auffallend ist der niedrige Trigonellingehalt von Coffea liberica mit nur 0,27 %.

Die Werte für Trigonellin decken sich bei den Arabicas und Robustas mit den Befunden von S l o t t a und N e i s s e r (10) und von M o o r e s und G r e n i n g e r (11), jedoch nicht mit den oft zitierten Angaben von N o t t b o h m und M a y e r (12). Der Grund für die Unstimmigkeiten ist, daß bei dem Bestimmungsverfahren der letztgenannten Autoren - es ist die erste Methode zur Ermittlung von Trigonellin, die ausgearbeitet wurde - das Trigonellin nicht vollständig aus dem Kaffee herausgeholt wurde. Hierauf ist auch schon von H a d o r n und S u t e r (9) hingewiesen worden.

Was den sehr niedrigen Trigonellingehalt von Coffea liberica angeht, so sind in der Literatur nirgends zuverlässige Angaben zu finden. Um sicherzustellen, daß es sich hier nicht um ein zufälliges Ergebnis handelte, wurden noch vier weitere Libericaproben untersucht. Die Ergebnisse sind zusammen mit denen der Coffein- und Fettbestimmung für alle Libericaproben in Tabelle 2 dargestellt. Diese zeigt, daß der niedrige Trigonellingehalt tatsächlich eine Sorteneigentümlichkeit von Libericakaffee ist.

Ein Vergleich des Gesamtfettgehaltes der Proben ergibt, daß dieser ebenso wie die Coffein- und Trigonellinwerte artgebunden zu sein scheint. So stehen die 5 Arabicas mit Fettwerten um 17 % i.T. den 5 Liberica- und 2 Robustaproben mit um 11 % Fett i.T. gegenüber.

ABB. 1 : VERGLEICHENDE DARSTELLUNG

von EIWEISS-, COFFEIN-, TRIGONELLIN- UND FETTGEHALT DER KAFFEE-PROBEN.

(dargestellt in % der fetthaltigen Trockenmasse)

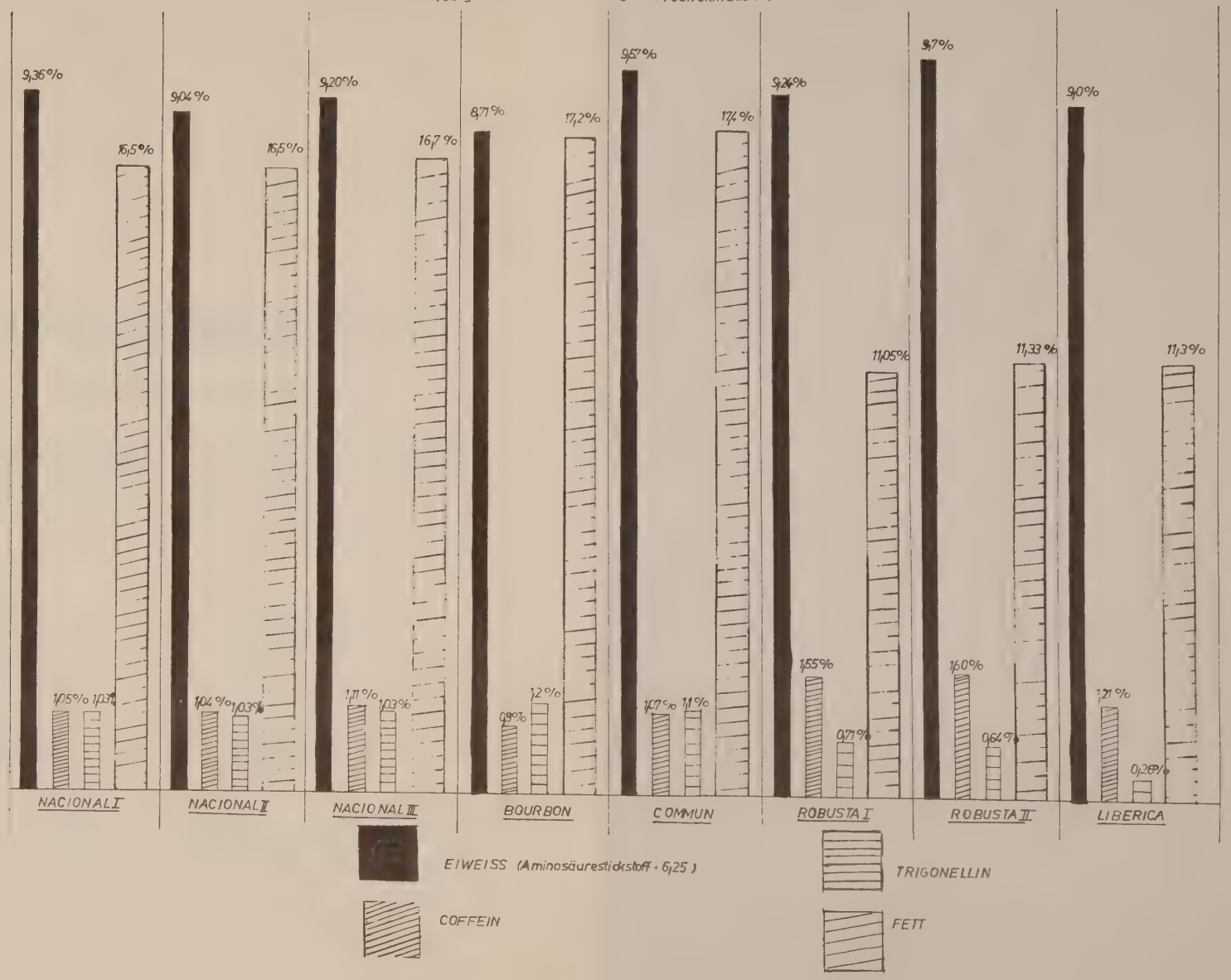


Tabelle 2: Coffein-, Trigonellin- und Fettgehalt verschiedener Proben von Coffea liberica.

Probe Nr.	Coffein % i.T.	Trigonellin % i.T.	Fett % i.T.
1	1,21	0,26	11,3
2	1,55	0,24	10,9
3	1,32	0,26	11,6
4	1,22	0,25	12,0
5	1,51	0,27	11,6

III. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Kaffee-Eiweisses.

1. Qualitative Voruntersuchung

Zur Orientierung über die qualitative Aminosäurenzusammensetzung von Kaffee-Eiweiß wurde zunächst aus dem Eindampfrückstand eines salzsauren Kaffeehydrolysates eine Untersuchung mittels zweidimensionaler Papierchromatographie durchgeführt. +) Dabei ergab sich das Vorhandensein von 18 Aminosäuren, nämlich:

Alanin	Lysin
Arginin	Methionin
Asparaginsäure	Phenylalanin
Cystin	Prolin
Glutaminsäure	Serin
Glycin	Threonin
Histidin	Tryptophan
Isoleucin	Tyrosin
Leucin	Valin

+) Laufmittel 1. Dimension: n-Butanol:Methyläthylketon:8,5 n Ammoniak = 5 : 3 : 2

Laufmittel 2. Dimension: Isobutanol: 53 % Ameisensäure = 75 : 25

Das stimmt mit den Angaben von Underwood und Deatherage (5), welche 14 Aminosäuren festgestellt hatten und den Befunden von Barbera (2) überein, der Prolin, Cystin und Methionin als Bausteine des Kaffee-Eiweißes nachgewiesen hat. Im Ganzen waren demnach einschließlich von Tryptophan, das bei der Hydrolyse in der Regel völlig zerstört wird und durch Farbreaktion im nichthydrolysierten Eiweiß nachzuweisen ist, bisher 17 Aminosäuren im Kaffeeprotein bekannt. Bei der zweidimensionalen Papierchromatographie wurde nun zudem noch Isoleucin als weiterer Bestandteil des Eiweißes gefunden.

Underwood und Deatherage hatten für ihre Untersuchungen, die schon 1952 veröffentlicht wurden, die damals übliche papierchromatographische Technik verwendet, bei welcher das Isoleucin vermutlich von Leucin überdeckt wurde. Bei ihren quantitativen Bestimmungen benützten sie eine verhältnismäßig kurze Säule mit einer Füllung eines relativ grobkörnigen Austauscherharzes. Bei dieser Versuchsanordnung wird zwar die Arbeitszeit erheblich verkürzt, aber auch die Trennschärfe der Säule verringert. Auch hier sind wohl Leucin und Isoleucin nicht getrennt worden.

2. Die quantitative Zusammensetzung des Kaffee-Eiweisses.

Unter Zugrundelegung der Methode von Moore, Spackman und Stein (13) wurden in der bei der Untersuchungsmethodik näher beschriebenen Weise nun die verschiedenen Kaffees auf ihre quantitative Aminosäurenzusammensetzung hin untersucht. Von den entfetteten und feingemahlenen Proben wurden jeweils 2 Hydrolysen durchgeführt und aus jedem der Hydrolysate die Aminosäuren mittels der Austauschersäule ermittelt. Unter Berücksichtigung des Fett- und Wassergehaltes der Proben rechnete man die gefundenen Aminosäurenwerte auf die fetthaltige Trockenmasse um. Es soll schon hier erwähnt werden, daß die quantitative Bestimmung der Komponenten eines Aminosäurengemisches mittels der genannten Methode in recht befriedigender Weise durchführbar ist. Die Schwierigkeiten

die sich auch heute noch einer exakten Eiweißbausteinanalyse entgegenstellen, liegen vorwiegend bei der Hydrolyse des Proteins. Die 24stündige Behandlung des Untersuchungsmaterials mit starker Salzsäure bei einer Temperatur von ca. 110°C, die nicht zu umgehen ist, hat unweigerlich eine gewisse Zerstörung empfindlicher Aminosäuren zur Folge. Die Fehler, die dabei entstehen, sind nicht kontrollierbar und umso größer, je komplizierter die Untersuchungssubstanz zusammengesetzt ist, wobei vor allem Kohlenhydrate sich durch die Bildung von Maillardprodukten störend bemerkbar machen. Da grüner Kaffee von Natur aus 6 - 12 % Saccharose und außerdem in der Zellwand neben wenig Zellulose reichlich Galaktomannan, Galactan und Araban enthält, so sind die Fehlermöglichkeiten gerade in diesem Falle recht groß. Trotz dieser Schwierigkeiten ließ sich die Hydrolyse mit durchaus befriedigender Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchführen. Die Summe von Coffein-, Trigonellin-, Ammoniak- und Aminosäurenstickstoff machte bei sämtlichen untersuchten Kaffeesorten 92,8 - 104,4 % des Kjeldahlstickstoffs aus (siehe Tabellen I - VIII im Anhang). Die Differenzen gegenüber dem letzteren dürften sich neben den Zerstörungen durch Hydrolyse durch nicht ganz vermeidbare Fehler der Farbreaktion mit Ninhydrin sowie durch die dabei nicht immer exakt festlegbaren Blindwerte erklären lassen, wobei solche Abweichungen nach oben wie nach unten möglich sind. Es sei darauf hingewiesen, daß auch die Fehler augenscheinlich eine gewisse Reproduzierbarkeit besaßen. Trotzdem grundsätzlich von jeder Kaffeeprobe zwei voneinander gänzlich unabhängige Hydrolysen mit nachfolgender Aminosäurenbestimmung, und zwar zu verschiedenen Zeiten - also nicht nebeneinander -, durchgeführt wurden, stimmt die Stickstoffbilanz dieser beiden Untersuchungen jeweils sehr gut überein, wie gleichfalls aus den Tabellen I - VIII im Anhang zu entnehmen ist.

Es soll nun zunächst die Aminosäurenzusammensetzung von Kaffee-Gesamtprotein bei einer der untersuchten Kaffeeproben betrachtet werden, wobei als Beispiel die Probe Nacional I gewählt sei. Die angeführten Zahlenwerte sind die Mittelwerte der Parallelbestimmungen und der Tabelle I im Anhang entnommen. Sie sind ausgedrückt als Prozente der Aminosäuren,

bezogen auf Protein (Protein = Summe des Aminosäurenstickstoffs x 6,25).

Dabei zeigt sich nun, daß die Glutaminsäure der hauptsächlichste Bestandteil des Kaffeeproteins ist. Ihr Anteil beträgt 19,17 % und liegt damit weit über der Größenordnung der anderen Aminosäuren, wie das von vielen verschiedenen Eiweißarten bekannt ist.

Mengenmäßig ebenfalls nicht unbeträchtliche Anteile machen Asparaginsäure mit 9,9 % und Leucin mit 9,4 % aus. Mit einigem Abstand folgen Glycin (6,5 %), Lysin (6,5 %), Valin (6,0 %), Prolin (5,6 %), Phenylalanin (5,2 %), Arginin (5,1 %) und Serin (5,0 %).

Zwischen 4 % und 5 % liegen Alanin (4,9 %), Threonin (4,3 %) und Tyrosin (4,3 %), während Methionin mit 2,5 % und Histidin mit 2,4 % in der geringsten Menge vorhanden sind.

Besondere Schwierigkeiten bereitete die Ermittlung von Cystin und Tryptophan, da beide Aminosäuren bei der Hydrolyse weitgehend zerstört werden.

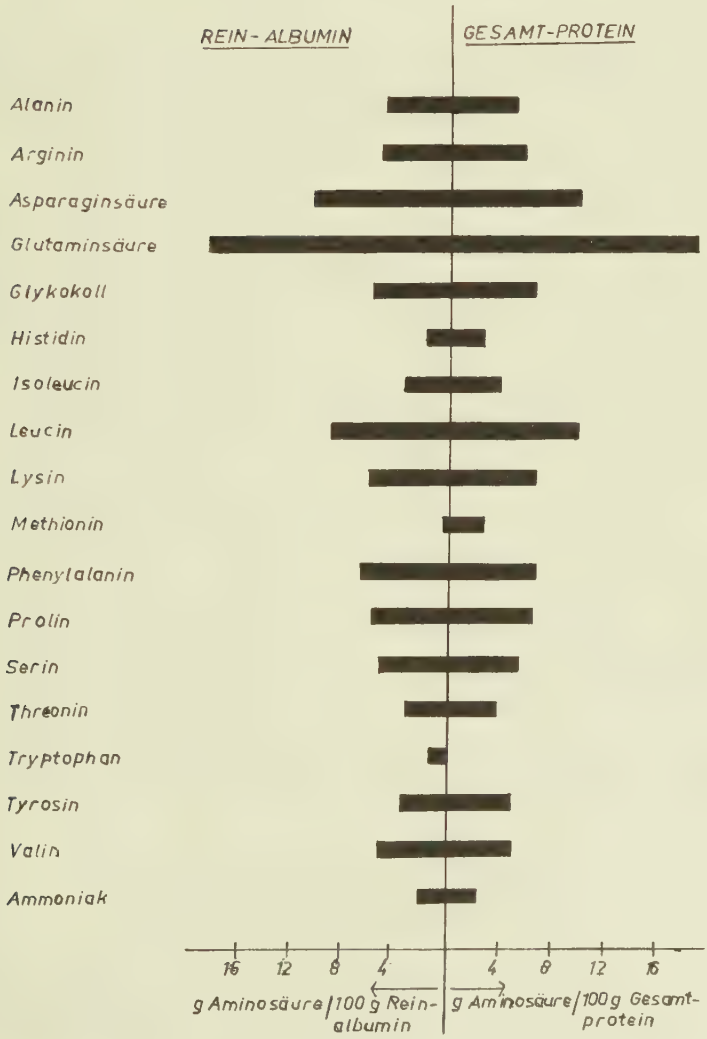
Die Bestimmung des Cystins wird vor allem durch die im Rohkaffee vorhandenen größeren Mengen von Kohlenhydraten behindert. Während ja schon bei der Hydrolyse von gereinigtem Eiweiß mit Verlusten an Cystin gerechnet werden muß, wird dieser Fehler in Anwesenheit von Kohlenhydraten noch in unkontrollierbarer Weise vergrößert. Als einzig praktisch durchführbare Möglichkeit erwies sich die Oxydation des Cystins zur Cysteinsäure vor der Hydrolyse. Die Cysteinsäure übersteht die Behandlung mit 6 n-Salzsäure bei etwa 110°C und kann daher nach Abtrennung der übrigen Aminosäuren in einer Austauschersäule bestimmt werden. Auf diese Weise wurde der Gehalt an Cystin im Eiweiß der in Rede stehenden Kaffeeprobe zu 4,1 % festgestellt.

Für die Ermittlung des Tryptophans aus Rohkaffee konnte ein direkter Weg nicht gefunden werden. Selbst die umfassend durchgearbeitete Methode von S p i e s und C h a m b e r s (14,15), bei welcher Tryptophan direkt aus nichthydrolysiertem Proteinen sogar in Anwesenheit von Kohlenhydraten bestimmt werden kann, erwies sich als ungeeignet. Bei den Versuchen mit Rohkaffee stellte es sich nämlich heraus, daß

Abb. 2: AMINOSÄUREMUSTER von

Kaffee-Albumineiweiß und Kaffee-Gesamteiweiß

(Probe 5 „COMMUN")



(1 cm = 4 % Aminosäure des Eiweisses)

die Chlorogensäure, die ein charakteristischer Bestandteil des Kaffees ist, mit dem Reagenz p-Dimethylaminobenzaldehyd ähnliche Färbungen liefert wie das Tryptophan. Eine Abtrennung der Chlorogensäure vom Gesamteiweiß erwies sich als unmöglich. Um aber trotzdem einige Anhaltspunkte über den Tryptophangehalt des Kaffeeproteins zu gewinnen, wurde die wasserlösliche Albuminfraktion extrahiert und durch Fällung isoliert. Aus dem chlorogensäurefreien Eiweißanteil konnte der Tryptophangehalt mit 1,47 % des Reinalbumins ermittelt werden. Um sicher zu gehen, daß die wasserlösliche Proteinfraktion nicht allzu stark von der des Gesamtproteins abwich, wurde ein Teil der ersteren in der üblichen Weise hydrolysiert und untersucht.

Das Ergebnis ist in der Abb. 2 dargestellt. Der Vergleich mit der Zusammensetzung des Gesamteiweisses der gleichen Kaffeesorte (Probe 5) zeigt eine praktisch vollständige Übereinstimmung. Ein wesentlicher Unterschied ist lediglich im Gehalt an Methionin festzustellen. Vermutlich ist jedoch im Kaffeealbumin nicht weniger Methionin enthalten als im Gesamteiweiß. Bei der sonst auffallend guten Übereinstimmung der beiden Analysen ist vielmehr anzunehmen, daß das sehr empfindliche Methionin im Verlauf der Aufarbeitung - vermutlich bei der Hydrolyse - zerstört wurde. Die Methioninwerte von Paralleluntersuchungen des Gesamteiweisses zeigten in mehreren Fällen eine nicht ganz befriedigende Reproduzierbarkeit.

Ähnliche Differenzen, wenn auch nicht in solchem Ausmaße, sind auch im Gehalt an Histidin festzustellen, wovon das Albumin ebenfalls weniger als das Gesamtprotein enthält.

Zusammenfassend erscheint dennoch auf Grund dieser Untersuchungen der Schluß berechtigt, daß auch der Tryptophangehalt des Kaffee-Gesamteiweisses größenordnungsmäßig demjenigen des Albuminanteils entsprechen wird.

3. Vergleich der Eiweißzusammensetzung bei den verschiedenen Kaffeeproben.

Es sollen nun die Aminosäurenmuster der einzelnen Kaffeeproben an Hand der Abb. 3 und 4 und der Tabellen I - VIII im Anhang miteinander verglichen werden. Es war bereits oben gezeigt wor-

den, daß der Eiweißgehalt der untersuchten Proben überraschenderweise nur in verhältnismäßig geringen Grenzen schwankt. Ganz entsprechend können nun auch die Unterschiede der Aminosäurenmuster als denkbar gering bezeichnet werden. Sie sind jedoch vorhanden, obwohl eingeräumt werden muß, daß sie oft kaum die zwangsläufige Schwankungsbreite der Parallelbestimmungen überragen.

Auffallende spezifische Eigentümlichkeiten der Sorten können nicht festgestellt werden. Dagegen sind gewisse Verschiedenheiten zwischen einzelnen Proben ganz allgemein durchaus erkennbar. Diese sind aber innerhalb der Sorten genau so groß bezw. noch auffallender als zwischen Proben verschiedener Sorten. Es hat somit mehr den Anschein, daß keine besonderen sortentypischen Eiweißbaupläne vorliegen, sondern daß diese Unterschiede mehr durch andere Einflüsse, wie z.B. nicht ganz einheitliche Reifestadien der Samen, bezw. durch klimatische oder geologische Gegebenheiten entstanden sind.

Vergleicht man beispielsweise das Aminosäurenmuster des Proteins von "Nacional I" mit demjenigen von "Nacional II", so fallen bei dem letzteren der höhere Glutaminsäureanteil von 20,7 % sowie die höheren Serin- und Prolinanteile (6,8 bezw. 6,9 %) auf. Außerordentlich niedrig erscheint jedoch mit 3,7 % der Argininingehalt dieses Proteins. Demgegenüber zeigt der doch sortenmäßig verwandte "Nacional III" gerade umgekehrt relativ niedere Glutaminsäure- (18,5 %) und höhere Argininwerte (5,4 %) sowie außerdem noch etwas erhöhte Werte für Phenylalanin (6,3 %). Die Abweichungen der übrigen Aminosäuren dieser drei Proben liegen innerhalb der Fehlerbreite der Parallelbestimmungen, die bei manchen Aminosäuren, wie z.B. beim Prolin und Methionin, mitunter ziemlich groß ist. Diese Tatsache hat im Falle des Prolins ihre Ursache in dem niedrigen Farbwert dieser Aminosäure und den deshalb immer schwer auswertbaren Extinktionen. Beim Methionin ist sie in der Empfindlichkeit dieser Aminosäure gegenüber der Hydrolyse und der geringen Menge ihres Vorkommens begründet.

Die Probe 4 "Bourbon" hat bezogen auf Trockenmasse von allen Proben die geringste Proteinmenge. Sie enthält in ihrem Eiweiß den höchsten Gehalt an Arginin (6,1 %) und Cystin (5,0 %).

Die andere schwefelhaltige Aminosäure, das Methionin, liegt jedoch mit 2,1 % in der üblichen Höhe. In den übrigen Aminosäuren unterscheidet sich diese Probe nicht wesentlich von den vorgenannten.

Die Probe 5 "Commun" weist in ihrem Aminosäurenmuster - außer etwas höheren Leucin- und Phenylalaninwerten (9,8 bezw. 6,6 %) - keine auffallenden Besonderheiten auf.

Demgegenüber zeichnet sich die Probe 6 "Robusta I" durch den niedrigsten Gehalt an Glutaminsäure (17,3 %) und die höchsten Anteile von Glycin (8,0%) und Alanin (6,1 %) aus. Der Cystingehalt ist gegenüber den vorigen Proben erniedrigt (3,8 %).

Das Aminosäurenmuster des "Robusta II" hat mit dem des "Robusta I" keine besondere Ähnlichkeit. Zwar ist der Cystingehalt mit 3,6 % gleichfalls erniedrigt, jedoch liegen Glutaminsäure (18,6 %), Glycin (7,1 %) und Alanin (4,9 %) in normaler Höhe. Etwas erniedrigt sind die Werte von Isoleucin, Leucin und Methionin (3,4 %, 8,4 % bezw. 1,3 %).

Das Eiweiß der Probe 8 "Liberica" weicht von den meisten anderen Proben durch höheren Gehalt an Phenylalanin (7,0 %), Tyrosin (5,5 %) und Valin (6,7 %) ab. Dagegen ist hier der Argininanteil (3,2 %) am niedrigsten. Im übrigen zeigt aber auch das Aminosäurenmuster dieser Probe Übereinstimmung mit denjenigen der anderen Kaffeesorten.

Irgendwelche gesetzmäßigen Beziehungen zu Umweltseinflüssen aus den beobachteten Verschiedenheiten abzuleiten, erscheint auf Grund der vorhandenen Unterlagen als nicht möglich und lag auch nicht in der Zielsetzung dieser Arbeit. Zweifellos wären dazu einheitlichere Kaffeemuster und die Durchuntersuchung einer größeren Anzahl derselben erforderlich.

IV. Vergleich der eigenen Untersuchungsergebnisse mit denjenigen von Underwood und Deatherage

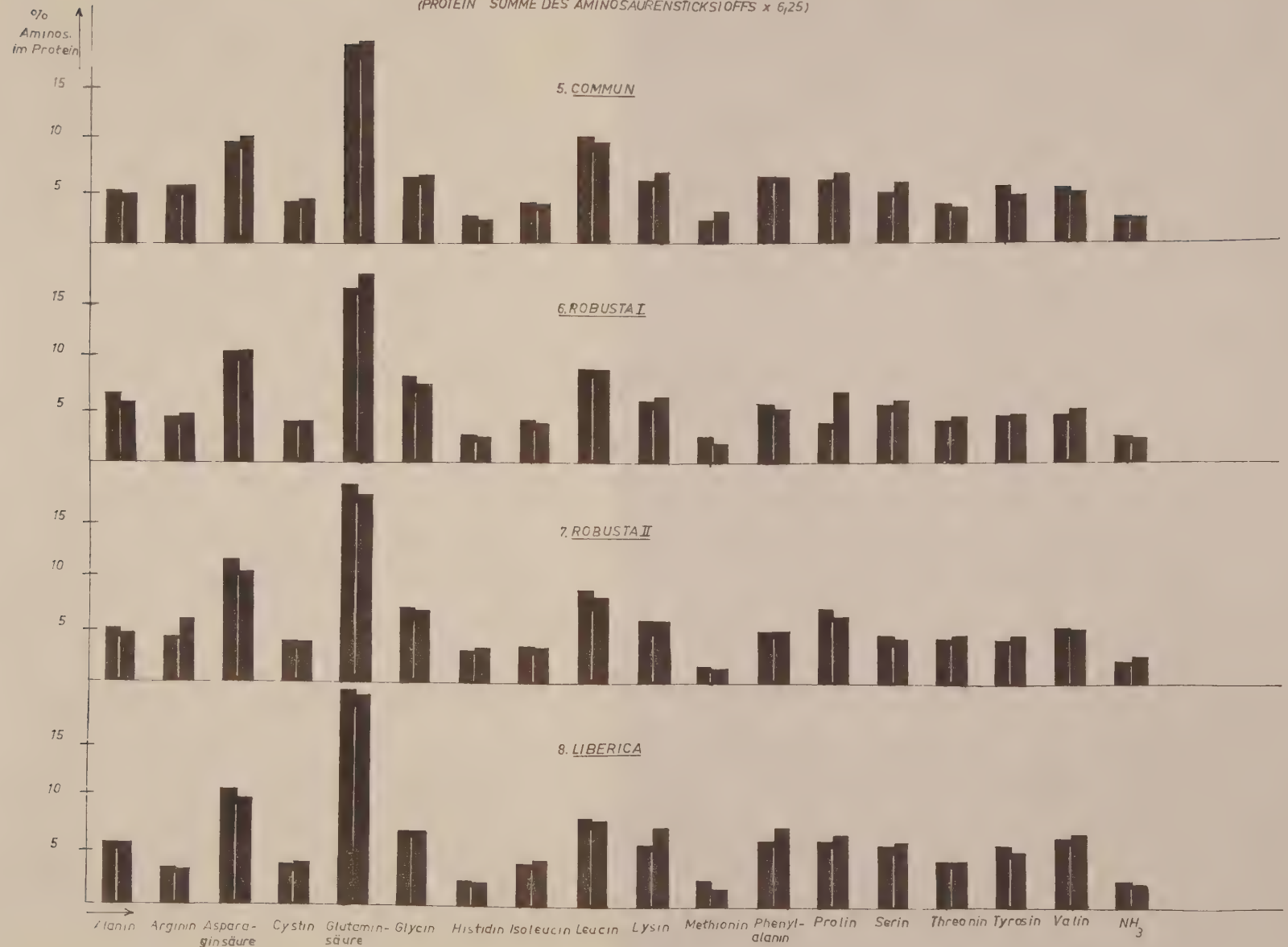
Es war bereits eingangs erwähnt worden, daß von U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e schon 1952 eine Untersuchung des Kaffee-Eiweisses vorgenommen wurde. Diese Autoren hatten jedoch nur neun Aminosäuren quantitativ bestimmt. Sie berechneten den von ihnen gefundenen Aminosäurenstickstoff

ABB. 3: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG

DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG VON VERSCHIEDENEN KAFFEEPROBEN I

(PROTEIN = SUMME DES AMINOSÄURENSTICKSTOFFS x 6,25)

ABB. 4: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG
DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG VON VERSCHIEDENEN KAFFEEPROBEN II
(PROTEIN SUMME DES AMINOSÄURENSTICKSTOFFS x 6,25)



auf die Trockenmasse der grünen Bohne. Die von ihnen gefundenen Werte sind den an der Probe "Nacional I" ermittelten eigenen Ergebnissen in der Tabelle 3 gegenübergestellt.

Ein Vergleich der jeweiligen Werte ist nun zwar bezüglich der Aminosäurenwerte in der Trockenmasse möglich, jedoch nicht für die Aminosäurenzusammensetzung des Eiweisses. U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e haben bei ihrer Untersuchung des Proteins eines Santoskaffees zwar den Gesamtstickstoff (2,18 % der wasserfreien grünen Bohne), sowie das Coffein, nicht aber das Trigonellin ermittelt. Der tatsächliche Gehalt des von ihnen untersuchten Santos an Protein ist infolgedessen nicht bekannt, wenn auch nach den eigenen Befunden große Unterschiede im Eiweißgehalt der verschiedenen Sorten nicht zu erwarten sind. Die einzige Möglichkeit zu einem Vergleich besteht darin, das Verhältnis der Mengen der neun Aminosäuren zueinander zu errechnen. Es wurde deshalb das Threonin, das bei U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e mengenmäßig den kleinsten Anteil ausmacht, sowohl bei dem Santos wie bei dem Nacional I als Bezugssubstanz gewählt und = 1,00 gesetzt. Die auf dieser Berechnungsgrundlage gewonnenen Verhältniszahlen der einzelnen Aminosäuren sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Ein Vergleich dieser Verhältniszahlen läßt ganz erhebliche Unterschiede bei den 2 Kaffeeproben erkennen. Die Ursache dieser Differenzen liegt ohne Zweifel in der nicht ausreichenden Trennschärfe der von U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e verwendeten Apparatur. Es sei hier nochmals daraufhingewiesen, daß die Untersuchung der verschiedenen Proben von Arabica, Robusta und Liberica eine weitgehende Übereinstimmung in der mengenmäßigen Verteilung der in Rede stehenden neun Aminosäuren ergab. Es liegt kein Grund zu der Annahme vor, daß die von U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e bearbeitete Santos-Arabica Sorte sich so stark von diesen acht Kaffeeproben verschiedenster Herkunft unterschieden haben soll. Ein Anhalt dafür, daß bei der Untersuchung der beiden Autoren die einzelnen Aminosäuren ungenügend getrennt wurden, liefert ein Vergleich einiger Werte der Tabelle 3, soweit ein solcher möglich ist. Nach U n d e r w o o d und D e a t h e r a g e macht der Leu-

Tabelle 3: Vergleich der Aminosäurenanalyse von Santos-Rohkaffee nach Underwood und Deatherage mit den eigenen Befunden an Nacional I

Aminosäuren in der Reihenfolge des Austritts aus der Säule	Aminosäuren-Stickstoff in Santos % i.T.	Nacional I[+] % i.T.	Verhältnis der Aminos.-N-Werte innerh. der Sorten, bez. jeweils auf Threonin = 1,00 Santos	Nacional I
Asparaginsäure	0,135	0,098	5,00	2,08
Threonin	0,027	0,047	1,00	1,00
Serin	0,042	0,062	1,55	1,32
Glutaminsäure	0,232	0,175	8,59	3,73
Prolin	-	0,064		
Glycin	0,132	0,114	4,55	2,43
Alanin	0,074	0,072	2,74	1,53
Valin	0,062	0,067	2,30	1,42
Methionin	-	0,022		
Isoleucin	-	0,042		
Leucin	0,143	0,094	5,30	2,00
Tyrosin	-	0,031		
Phenylalanin	0,052	0,041	1,93	0,87
Lysin		0,117		
Histidin		0,060		
Arginin		0,153		
Cystin		0,045		

+) Die Stickstoff-Werte der Aminosäuren von Nacional I sind Mittelwerte der beiden Analysen.

cin-Stickstoff 0,143 % der Trockenmasse des Santoskaffees aus. Bei dem Kaffee "Nacional I" ist der Anteil des Leucinstickstoffs 0,094 %, derjenige des Isoleucin-Stickstoffs 0,042 %, was zusammen 0,136 % der Trockenmasse des Kaffees Nacional I ergibt. Mit anderen Worten: Die Summe des Leucin- und Isoleucinstickstoffs stimmt größenordnungsmäßig mit dem von den amerikanischen Autoren ermittelten Anteil des "Leucinstickstoffs" an der Kaffeetrockenmasse überein. Man kann daraus mit einiger Sicherheit schließen, daß die letzteren die beiden Aminosäuren nicht zu trennen vermochten und als "Leucin" berechneten.

V. Zusammenhänge zwischen den Stickstoffsubstanzen und dem Aroma von Kaffee

Aus den im Vorhergehenden beschriebenen Untersuchungen geht einwandfrei hervor, daß die quantitativen Unterschiede im Aminosäurenmuster der acht Kaffeeproben viel zu gering sind, als daß ein Mehr oder Weniger der einen oder anderen Aminosäure einen wirklich wesentlichen Einfluß auf das Aroma des gerösteten Kaffees haben könnte. Selbst unter Berücksichtigung der Untersuchungen von R o t h und T h o m a s (4), die bereits in der Einführung erwähnt wurden, scheint es zweifelhaft, daß die nur in so geringen Grenzen schwankende Zusammensetzung des Kaffeeproteins sich in solchen extremen Aromaunterschieden ausprägen könnte, wie sie zwischen einem harten und einem weichen Kaffee bestehen.

Das Coffein beteiligt sich, soviel bis jetzt bekannt ist, nicht an der Aromabildung. Es stehen somit hier nur noch die einwandfreien und auffallenden Unterschiede im Trigonellingehalt zur Diskussion. Die Arabicasorten enthalten 1,03 - 1,20 % Trigonellin, die Robustas dagegen 0,64 - 0,71 % und die Libericas 0,24 - 0,27 %. Daß das Trigonellin bei der Rösttemperatur von 200 - 230°C zum Teil zerstört wird, ist bekannt, ebenso, daß sich bei dieser thermischen Zersetzung unter anderem Nicotinsäureamid bildet. H u g h e s und S m i t h (1) haben auch festgestellt, daß mit zunehmendem Röstgrad das Trigonellin abnimmt, während der Pyridingehalt des gerösteten Kaffees steigt. Ob

freilich der Trigonellingehalt eines grünen Kaffees allein dafür verantwortlich ist, daß die betreffende Kaffeesorte zur Gruppe der "harten" Kaffees mit ihrem typischen"Pyridingeruch" zu rechnen ist, erscheint sehr fraglich. Wenn auch die Unterschiede zwischen Coffea arabica, Coffea robusta und Coffea liberica in dieser Beziehung erheblich sind, so sind doch auch hier wieder die Schwankungen im Trigonellingehalt der einzelnen Arabicasorten viel zu gering, als daß sie für sich allein schon so auffallende Unterschiede im Aroma wie sie zwischen einem harten und einem weichen Kaffee bestehen, bedingen könnten.

Man kann zunächst nur annehmen, daß bei den sogenannten "harten"Kaffees die Pyridin- und Phenolkomponente des Röstaromas nicht so sehr durch einen erhöhten Gehalt an Pyridin- und Phenolderivaten entsteht, als vielmehr durch ein uns noch praktisch unbekanntes Zusammenwirken irgendwelcher anderer Bestandteile, wodurch gerade diese spezifische Geruchskomponente betont wird.

Ähnliches mag auch für den bei weichen Kaffees mehr oder weniger hervortretenden Merkaptangeruch gelten, wobei die Bezeichnung "Merkaptan" cum grano salis zu verstehen ist. Wirkliche Merkaptane sind mengenmäßig unter den Bestandteilen des Kaffeearomas nur in recht geringem Ausmaß vertreten. Die Hauptmenge der Schwefelverbindungen liegt in Form von Schwefelwasserstoff, Dimethylsulfid, Thiophen und ähnlichen Verbindungen vor. Was die Intensität des Geruches angeht, so vermögen diese Stoffe allerdings mit dem Merkaptan kaum zu konkurrieren. Jedenfalls spielen aber die flüchtigen Schwefelverbindungen im gerösteten Kaffee eine nicht minder wichtige Rolle wie die Pyridinderivate. So ist z.B. von P r o c t o r und S e g a l l (16) gezeigt worden, daß die Qualität eines Kaffeeaufgusses organoleptisch um so besser beurteilt wurde, je höher der Gehalt an flüchtigen Schwefelverbindungen war. Vergleicht man aber den Gehalt der hier untersuchten fünf Arabicaproben an Cystin und Methionin mit demjenigen derbeiden Robustaproben, so sind die Unterschiede wiederum viel zu gering, um hiervon die erheblichen Aromadifferenzen dieser beiden Kaffeearten ableiten zu können.

Alles in allem genommen, kann man aus dem bisher vor-

liegenden Material nur soviel entnehmen, daß ein unmittelbarer Einfluß der einen oder anderen Substanz auf das Aroma des gerösteten Kaffees nicht zu beweisen ist. Zwar enthalten die Arabicasorten verhältnismäßig viel Trigonellin, welches beim Rösten zum Teil Pyridin liefert.Wir finden aber unter den Arabicasorten ausgesprochen "weiche" Kaffees, deren Trigonellingehalt um mehr als 50 % höher ist, als der eines "harten" Robusta.

Das Problem der Entstehung der drei Grundtypen des Aromas des gerösteten Kaffees liegt, soweit es sich bis jetzt überblicken läßt, bedeutend tiefer. Es dürfte sich hier im wesentlichen um ein uns bisher noch sehr weitgehend unbekanntes Zusammenwirken der äußerst zahlreichen Komponenten handeln, aus denen dieses Aroma besteht.

C. Untersuchungsmethodik.

I. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials und die neben der Eiweißanalyse durchgeführten Bestimmungen.

Zur Durchführung der Analysen mußten die einzelnen Proben in möglichst feine Pulverform gebracht werden. Da jedoch die fetthaltigen Kaffeebohnen mit einer Conduxmühle nur grob zermahlen werden konnten, wurde das so erhaltene Mahlgut mit Petroläther entfettet. Aus diesem Produkt konnte dann mit der oben erwähnten Mühle ein mehlfeines Pulver hergestellt werden. Die Entfettung wurde wie folgt durchgeführt:

Das grob zerkleinerte Rohkaffeepulver wurde mit der fünffachen Menge Petroläther (Kp. 50 - 70°C) übergossen, unter mehrfachem Umschütteln 8 Stunden stehen gelassen und auf dem Büchnertrichter abgesaugt. Die Operation wiederholte man noch zweimal in der gleichen Weise und trocknete das weitgehend entfettete Material an der Luft in einer flachen Schale. Quantitative Fettbestimmungen zeigten, daß das Kaffeepulver dann noch rund 1 % Fett enthielt.

Die Bestimmung des Fettgehaltes - sowohl im fetthaltigen wie im entfetteten Mahlgut - erfolgte nach Aufschluß mit 4 n-Salzsäure in der gleichen Weise wie z.B. die Fettbestimmung in Kakao-Erzeugnissen durchgeführt wird (17).

Zur Berechnung der Trockenmasse mußte in beiden Mahlprodukten der Wassergehalt ermittelt werden. Dies geschah durch Trocknen von jeweils 2 g Kaffeepulver bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz.

Die Gesamtstickstoffbestimmung im Kaffee war zur Aufstellung der Stickstoffbilanz erforderlich. Sie wurde nach der Kjeldahlmethode mit Selen als Katalysator durchgeführt.

Zur Feststellung der im Kaffee vorhandenen Mengen an Coffein und Trigonellin bewährte sich ausgezeichnet das Verfahren von Kogan, DiCarlo und Maynard (7). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war sehr gut. Die Werte von Parallelbestimmungen schwankten höchstens um ± 2 %. Es erwies sich allerdings als unumgänglich notwendig, die von den Auto-

ren vorgeschriebene spezielle Sorte von Magnesiumoxyd +) zu verwenden. Mit gewöhnlichem "leichtem" Magnesiumoxyd waren weniger befriedigende Resultate zu erzielen.

II. Die Eiweißanalyse

Die Ermittlung der Aminosäuren eines Proteins, die sog. "Eiweiß-Bausteinanalyse", zerfällt in drei voneinander getrennte Arbeitsabschnitte: Die Hydrolyse des Eiweisses, die Trennung der einzelnen Aminosäuren und schließlich deren quantitative Bestimmung. Jede dieser Teiloperationen ist im Laufe der letzten 15 Jahre verbessert und für die verschiedensten Zwecke mannigfach modifiziert worden. Für das vorliegende Untersuchungsmaterial mußten die am besten geeigneten Verfahren teilweise durch Vorversuche ausfindig gemacht werden. Die dann als befriedigend befundene Arbeitsweise ist im folgenden beschrieben.

1. Die Hydrolyse des Eiweisses.

Ziel der Eiweißhydrolyse ist es, das Protein möglichst schonend und vollständig in seine Einzelbausteine, die Aminosäuren zu zerlegen und so die Voraussetzung für deren Bestimmung zu schaffen.

Die ideale Lösung wäre natürlich, das Eiweiß vor der Hydrolyse von den anderen Stoffen abzutrennen, und dann gesondert zu hydrolysieren. In diesem Sinne schlägt K o f r a n y i (18) vor, das Eiweiß aus pflanzlichem Material mit 5n-Ameisensäure herauszulösen und anschließend mit alkalischer Quecksilberazetatlösung auszufällen. Mit diesem Verfahren gelang es jedoch K r a m p i t z (19) nicht, aus Gerste und Hafer alles Eiweiß in Lösung zu bringen. Beim Rohkaffee mit seinem hohen Anteil an widerstandsfähiger Gerüstsubstanz erschien es noch weitaus weniger erfolgversprechend.

Die Eiweißhydrolyse selbst kann auf mannigfache Weise ausgeführt werden. An grundsätzlichen Möglichkeiten seien hier genannt die Hydrolyse mit Säuren, die mit Alkalien und diejenige

---

+) Magnesium Oxide, U.S.P. Heavy powder, J.T.Baker Chemical Co., Phillipsburg N.J.

auf enzymatischem Wege.

Die enzymatische Hydrolyse, z.B. mit Pepsin, Trypsin oder Papain, soll nach K o f r a n y i (18) selbst bei langen Spaltungszeiten nur zu einem mangelhaften Spaltungsgrad führen. Sie hat jedoch besondere Bedeutung bei der Sequenzforschung erlangt, da verschiedene Enzyme nur ganz bestimmte Peptidbindungen spalten, und so charakteristische Bruchstücke liefern.

Die alkalische Hydrolyse mit Natron-, Kali- oder Barytlauge führt zur teilweisen Zerstörung der freigesetzten Aminosäuren, besonders der basischen (18). Zur Tryptophanbestimmung wird sie jedoch mitunter der sauren Hydrolyse vorgezogen.

Die saure Hydrolyse erschien für die eigenen Zwecke am geeignetsten. Sie wird meist mit Salzsäure durchgeführt und ergibt eine rasche und vollständige Freisetzung der Aminosäuren, ist dabei aber schonender als die alkalische Hydrolyse. Daneben kann man auch von ihr erwarten, daß durch sie die Herauslösung des Eiweisses aus dem festen Zellgerüst gefördert wird.

Als besonders wichtig zur Erzielung befriedigender Ergebnisse erschien es aber, Verluste an Aminosäuren während der Hydrolyse durch Entstehung von Huminstoffen möglichst zu vermeiden. Hierzu haben sich zwei Prinzipien besonders bewährt. So haben einerseits D u s t i n und Mitarbeiter (20) nachgewiesen, daß durch starke Erniedrigung der Kohlenhydrat- und Eiweißkonzentration während der Hydrolyse Huminbildung und Aminosäurenabbau stark eingeschränkt werden können. Andererseits zeigte K r a m p i t z (19), daß durch Zusatz von Zinn(II)chlorid selbst bei verminderter Säurestärke eine rasche und vollständige Zerlegung der Proteine in Aminosäuren bei gleichzeitiger weitgehender Vermeidung von Huminbildung erreicht werden kann.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte stellte man deshalb Versuche mit Salzsäure verschiedener Konzentrationen, teilweise unter Zusatz von Zinn(II)chlorid, an. Schließlich wurde die Hydrolyse mit 3,3 n-Salzsäure unter Zusatz von Zinn(II)-chlorid bei starker Verdünnung der Substanz (400 mg Rohkaffee in 400 ml Säure) als das geeignetste Verfahren befunden, da hierbei helle teefarbene, peptidfreie Hydrolysate erhalten wurden, die gut reproduzierbare hohe Aminosäurenwerte lieferten. Im

einzelnen erfolgte die Hydrolyse des Rohkaffees in der folgenden Weise:

A r b e i t s v o r s c h r i f t

a) Reagentien:

3,3 n-Salzsäure: Salzsäure p.a. (d=1,19) wird zu einer 20 %igen Salzsäure verdünnt und in einer Schliffapparatur im Vakuum destilliert. Der Gehalt des Destillates an Chlorwasserstoff wird dann aräometrisch ermittelt und auf eine Normalität von 3,3 eingestellt.
Zinn(II)chlorid p.a.
Schwefelwasserstoff

b) Durchführung der Hydrolyse:

0,4 g des entfetteten Rohkaffeepulvers werden mit 0,4 g Zinn(II)chlorid und 400 ml 3,3 n-Salzsäure versetzt und im Glycerinbad von 110 - 120°C 24 Stunden unter Rückfluß hydrolysiert. Nach dieser Zeit wird die Hydrolyse abgebrochen und das Hydrolysat im Vakuum auf dem Wasserbad bis auf etwa 10 ml eingedampft. Nach Zusatz von ca. 100 ml Wasser kann nun mit Schwefelwasserstoff das Zinn als Sulfid ausgefällt und abfiltriert werden. Das klare bezw. durch Schwefel leicht getrübte Filtrat wird darauf erneut im Vakuum auf etwa 10 ml eingeengt, wodurch der Schwefelwasserstoff entfernt wird und die leichte Trübung meist verschwindet. Diesen Rückstand führt man dann in einen 100 ml Meßkolben über, füllt mit Wasser auf und versetzt die Lösung zur Konservierung mit einem kleinen Körnchen Thymol. Bis zur säulenchromatographischen Untersuchung, die möglichst nicht später als nach 3 - 4 Tagen erfolgen soll, wird die Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

2. Die Trennung der Aminosäuren.

Für die Trennung von Aminosäurengemischen an Ionenaustauschersäulen, wie sie zuerst von M o o r e und S t e i n 1951 (21) angegeben wurde, sind im Laufe der letzten Jahre zahlreiche Ausführungsformen bekanntgegeben worden. Da die Durchführung des von M o o r e und S t e i n 1954 (22)

veröffentlichten kontinuierlichen Verfahrens, bei welchem das zur Elution der Aminosäuren benutzte Puffergemisch laufend seinen PH-Wert ändert, apparativ etwas umständlich erschien, wurde eine diskontinuierliche Arbeitsweise bevorzugt. Hierbei wird die Austauschersäule nacheinander mit Pufferlösungen von verschiedenem pH behandelt. Das diskontinuierliche Verfahren von M o o r e und S t e i n von 1951, das z.B. auch noch S c h o r m ü l l e r leicht abgewandelt angewandt hat (23), ist aber in seiner Trennschärfe nicht sehr befriedigend. Da demgegenüber die jüngste von M o o r e , S p a c k m a n und S t e i n 1958 veröffentlichte modifizierte Methode (13) eine bedeutend bessere Trennschärfe bei wesentlich einfacherer Arbeitsweise aufweist, wurde diese den eigenen Untersuchungen zugrunde gelegt und gemäß den Arbeitsbedingungen nur wenig abgeändert. Die sauren und neutralen Aminosäuren werden nach dieser Methode wie bisher an einer Säule getrennt, die jedoch 150 cm hoch mit Harz gefüllt wird, anstatt nur 100 cm hoch, wodurch sich die Trennschärfe wesentlich erhöht. An Stelle des Austauscherharzes Dowex 50 x 8 wird das etwas feinere Amberlite CG 120/III D (45-60 µ) verwendet. Die basischen Aminosäuren werden an einer 15 cm-Säule getrennt, jedoch nicht wie bisher nacheinander mit 3 Puffern, sondern nur noch mit einem Puffer eluiert. Die Temperatur wird bei beiden Säulen einheitlich auf 50°C gehalten.

A r b e i t s v o r s c h r i f t

a) Geräte und Reagentien:

2 x 155 cm lange Säulen für wechselnde Inbetriebnahme mit eingeschmolzener G1-Fritte und innerem Durchmesser von 0,9 cm. Der Wassermantel der Säulen hat 2 cm Durchmesser und ist vom oberen Ende der Säulen 4 cm, vom unteren Ende 2 cm entfernt. Am unteren Ende der Säule befindet sich ein Schliffkern NS 14,5 zum Anschluß einer Auslaufspitze. Diese selbst ist etwa 8 cm lang, oben mit einer Schliffhülse NS 14,5 und seitlich mit einer Luftausgleichsöffnung ausgestattet. Am oberen Ende der Säule befindet sich eine Schliffhülse NS 14,5 zum Anschluß eines Dreiwegehahnes, der mittels eines PVC-Schlauches mit dem Aus-

laufrohr eines 500 ml-Scheidetrichters verbunden ist. Der Dreiwegehahn dient zum Absaugen des Luftpolsters unterhalb des Hahnes nach Anschluß der Elutionsflüssigkeit auf die Säule.

2 x 20 cm lange Säulen mit eingeschmolzener G1-Fritte und sonstigen Abmessungen wie bei den obigen Säulen. Jedoch befindet sich am oberen Ende dieser Säulen kein Schliff, da bei dem geringeren Betriebsdruck der kurzen Säulen der PVC-Schlauch einfach über das obere Rohrende gestülpt werden kann.

1 Umlaufthermostat zur Temperatureinstellung im Wassermantel.

1 Fraktionssammler: Es wurde das Gerät Chromatopart der Firma Bender & Hobein GmbH, München, verwendet.

1 Stickstoffbombe mit Feinreduzierventil.

Ionenaustauscherharz Amberlite CG 120/III D (45 - 60 u)

0,2 m-Citratpuffer pH 3,25: 42 g Citronensäure, 16,5 g Natronlauge, 21,3 ml konz. Salzsäure in 2 000 ml Wasser.

0,2 m-Citratpuffer pH 4,25: 42 g Citronensäure, 16,5 g Natronlauge, 9,4 ml konz. Salzsäure in 2 000 ml Wasser.

0,35 m-Citratpuffer pH 5,28: 49,1 g Citronensäure, 28,8 g Natronlauge, 13,6 ml konz. Salzsäure in 2 000 ml Wasser.

Die pH-Werte der Puffer müssen mit dem pH-Meßgerät geprüft und gegebenenfalls korrigiert werden. Zur Konservierung werden die Pufferlösungen je mit einem erbsengroßen Stückchen Thymol versetzt.

Thiodiglykol reinst, redestilliert.

b) Vorbereitung des Harzes und Füllung der Säulen.

Das angegebene Ionenaustauscherharz erwies sich in der handelsüblichen Form als zu dicht. Es wird deshalb mit dem mindestens 20-fachen Volumen Wasser aufgeschlämmt und die feine nicht absitzende Trübung nach einiger Zeit mittels eines Hebers abgesaugt. Dieses Verfahren wird mehrmals wiederholt, bis das überstehende Wasser klar bleibt.

Dieses Harz wird zur Füllung der langen Säule mit der doppelten Menge Puffer pH 3,25 versetzt und in mehreren Portionen in die Säule gefüllt. Die untersten 3 cm der Füllung werden durch Schwerkraft zum Absitzen gebracht, die weitere Füllung

erfolgt unter Stickstoffdruck von etwa 0,4 atü. Eine Füllhöhe von 140 cm erwies sich als ausreichend. Nach der Füllung wird die Säule zunächst mit 0,2 n-Natronlauge durchgespült und daraufhin mit Puffer pH 3,25 analysenbereit gemacht. Die kleine Säule füllt man in entsprechender Weise bis zu etwa 18 cm Höhe, wobei jedoch anstatt Puffer pH 3,25 der Puffer pH 5,28 benutzt wird.

c) Der Trennungsgang auf der Säule.

Bereits vor Beginn der Analyse wird der Wassermantel der zur Analyse vorgesehenen Säule mit Hilfe des Umlaufthermostaten auf 50°C geheizt und während der ganzen Analyse bei dieser Temperatur gehalten. Am geeignetsten erwies sich eine Beladungskapazität von etwa 1 - 2 mg Aminosäurengemisch. Diese Menge wird mittels einer 2 ml-Pipette vorsichtig auf die Oberfläche der Harzsäule aufgetragen. Nach dem Einsickern wird das überstehende Säulenrohr mit heißer Pufferlösung gefüllt und daraufhin der Scheidetrichter mit dem Puffer angeschlossen.

Für die Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren werden hierzu 500 ml Pufferlösung pH 3,25 zum Sieden erhitzt und danach 5 ml Thiodiglykol als Antioxydans zugesetzt. Durch das Erhitzen soll der Puffer soweit gasfrei gemacht werden, daß bei der Betriebstemperatur von 50°C in der Säule keine Luftblasen auftreten. Durch den Thiodiglykolzusatz sollen Verluste an Methionin vermieden werden. Die Mischung wird noch heiß in den 500 ml-Scheidetrichter eingegossen, zur Fernhaltung von Sauerstoff mit einer Schicht von flüssigem Paraffin bedeckt und der Scheidetrichter mit der Säule mittels eines PVC-Schlauches verbunden. In die obere Öffnung des Scheidetrichters setzt man einen durchbohrten Gummistopfen mit kurzem Glasrohr ein und schließt dieses mit einem Schlauch an eine Stickstoff-Flasche an, durch welche ein leichter Druck auf die Anlage ausgeübt werden kann. An das untere Ende der Säule wird der Fraktionssammler angebracht und das Eluat in Fraktionen von 2 ml aufgefangen. Der Druck wird so reguliert, daß in der Stunde etwa 8 - 10 ml Eluat austreten, entsprechend 4 - 5 Fraktionen. Der Stickstoffdruck soll hierbei 0,5 atü nicht wesentlich übersteigen. Nach Durchlauf von 150 Fraktionen wird der eluierende Puffer pH 3,25

gegen den Puffer pH 4,25 ausgewechselt. Hierzu werden wiederum 500 ml Puffer erhitzt, mit Thiodiglykol versetzt und in der beschriebenen Weise in einen Scheidetrichter unter Paraffin eingefüllt. Der Anschluß der neuen Pufferlösung an die Säule soll möglichst heiß erfolgen. Die Geschwindigkeit der Eluierung wird über Nacht etwas gedrosselt. Nach 280 Fraktionen kann die Trennung abgebrochen werden, was nach maximal 3 Tagen erreicht ist.

Für die Trennung der basischen Aminosäuren wird der Puffer pH 5,28 vorher ebenfalls erhitzt, jedoch wird kein Thiodiglykol zugesetzt. Der Stickstoffdruck wird für die kleine Säule reduziert und die Eluierungsgeschwindigkeit auf etwa 24 ml Auslauf/Stunde bezw. 12 Fraktionen/Stunde reguliert. Nach 100 Fraktionen, also nach etwa 8 Stunden kann die Eluierung als vollständig betrachtet werden. Die Regenerierung der Säulen erfolgt jeweils mit 0,2 n-Natronlauge. Danach werden die Säulen wieder mit Pufferlösung pH 3,25 bezw. 5,28 gesättigt und so betriebsbereit gemacht.

3. Quantitative Bestimmung der Aminosäuren.

Die auf der Austauschersäule getrennten Aminosäuren müssen nun quantitativ bestimmt werden, wozu üblicherweise ihre Farbreaktion mit Ninhydrin ausgenützt wird. Die sichere Durchführung der Reaktion bietet jedoch einige Schwierigkeiten.

Wie man allgemein annimmt, wird bei dieser Farbreaktion die Aminosäure oxydativ desaminiert und das Ninhydrin gleichzeitig zu Hydrindantin reduziert. Aus Hydrindantin und Ammoniak bildet sich dann der blaue Farbstoff Diketohydrindylidendiketohydrindamin. Da aber Hydrindantin sehr leicht, z.B. schon durch Luftsauerstoff reversibel wieder in Ninhydrin übergeht, ist eine quantitative Bestimmung der Aminosäuren nur bei einem Überschuß von Hydrindantin im Reagenz möglich. Dies wird durch Zusatz von Reduktionsmitteln bezw. durch Zusatz von Hydrindantin selbst zur Reagenzlösung erreicht. Die Reaktion erfordert außerdem genaue pH-Konstanz. Die Reagenzlösung muß im Dunkeln aufbewahrt werden.

Nach der Vorschrift von Y e m m und C o c k i n g (24) wird das Ninhydrinreagenz unter Zusatz von Kaliumcyanid hergestellt, wodurch die Lösung bei Zimmertemperatur ohne weitere

Vorsichtsmaßregeln mindestens eine Woche lang haltbar sein soll. Dieser Befund konnte nicht bestätigt werden. Schon nach 24 Stunden zeigten sich oft starke Abnahmen in der Extinktion. Zudem erwies sich die Menge der Aminosäuren als nicht direkt proportional der Extinktion.

Es wurde deshalb das Ninhydrinreagenz nach der Vorschrift von M o o r e und S t e i n (25) hergestellt und in schwarzer Flasche unter gereinigtem Stickstoff aufbewahrt. Entsprechend der an hiesigen Instituten erprobten Verfahrensweise, gab man jedoch an Stelle von Hydrindantin selbst Zinn(II)chlorid zu +).

A r b e i t s v o r s c h r i f t

a) Geräte und Reagentien:

Eppendorf-Photometer

Methylglykol: Dieses soll möglichst frei von Peroxyden sein. (Mit einer 5 %igen Kaliumjodidlösung soll es höchstens blaßgelb gefärbt werden). Zur Reinigung wird Äthylenglykolmonomethyläther Merck (= Methylglykol) mit etwas Eisen(II)sulfat versetzt, nach öfterem Schütteln über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag im Vakuum abdestilliert. Haltbarkeit: 1 - 2 Wochen.

Ninhydrin p.a.

Zinn(II)chlorid p.a.

4 n-Natriumacetatpuffer: pH 5,50: 544 g Natriumacetat . 3 H_2O werden in 400 ml Wasser im Dampfbad gelöst, abgekühlt, mit 100 ml Eisessig versetzt und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Der Puffer soll einen pH-Wert von 5,50 $\pm$ 0,03 haben, was mit dem pH-Meßgerät nachgeprüft werden muß.

n-Propylalkohol 50 vol.%ig

b) Bereitung des Ninhydrinreagenzes:

Das Reagenz wird in einer schwarz gestrichenen Flasche, die nur an der Seite ein kleines Fenster trägt, unter gereinigter Stickstoff-Atmosphäre und unter Vorschaltung einer Schwefelsäure-Waschflasche zusammengemischt.

+) Nach persönlichem Hinweis von Herrn Dr. Hannig, Max Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

Für 100 ml Reagenz gibt man dabei zu 75 ml Methylglykol 2 g Ninhydrin. Nach Lösung des letzteren fügt man 0,1 g Zinn(II)-chlorid zu, wodurch eine milchige Trübung entsteht. Nach Zugabe von 25 ml Natriumacetatpuffer tritt jedoch wieder Klärung ein. Das Reagenz wird nun möglichst unter Stickstoff-Druck aufbewahrt und das Fenster mit schwarzem Papier umhüllt. Dieses Reagenz ist eine Woche haltbar und gibt mit Aminosäuren reproduzierbare Werte. Die Menge einer Aminosäure erwies sich als der Extinktion direkt proportional. Vorsichtshalber wird das Reagenz spätestens nach 3 Tagen frisch bereitet.

c) Die Bestimmung der Aminosäuren:

Die aus der Säule aufgefangenen Fraktionen werden zum Zwekke der Aminosäurenbestimmung nun jeweils in Chargen von etwa 30 Fraktionen weiterbehandelt. Hierzu versetzt man die einzelnen Fraktionen von 2 ml mittels einer Fortunapipette mit je 1 ml Ninhydrinreagenz und schüttelt daraufhin die mit Gummistopfen fest verschlossenen Fraktionsröhrchen alle zusammen 5 Minuten auf der Schüttelmaschine. Danach werden die Röhrchen für genau 20 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, anschließend in ein Gefäß mit kaltem Wasser überführt und im fließenden Wasser 3 Minuten abgekühlt. Nun werden die einzelnen Röhrchen mit je 5 ml 50 vol.%igen n-Propanols versetzt und nach festem Verschließen durch Gummistopfen durch mehrmaliges Kippen durchgemischt. Die Farbtiefe der Fraktionen wird in einer 1 cm Küvette im Eppendorf-Photometer mit dem Filter 578 gemessen. Nur Prolin wird mit dem Filter 436 bestimmt. Da die Extinktionswerte der einzelnen Aminosäuren immer auf mehrere Fraktionen verteilt sind, werden diese jeweils um den Blindwert verminderten Werte addiert und die Summe mit dem durch die Eichmessung ermittelten Faktor auf die Menge der Aminosäuren umgerechnet.

Eine teilweise Nachprüfung der von M o o r e und S t e i n (25) angegebenen Farbkorrekturfaktoren für die Extinktionen der einzelnen Aminosäuren, berechnet gegen die äquivalente Menge Leucin, zeigte gute Übereinstimmung der eigenen Ergebnisse mit den Angaben von M o o r e und S t e i n . Es wurden deshalb die von den genannten Autoren ermittelten Korrekturfaktoren allgemein verwendet.

4. Testanalysen

Durch Auftrag von Aminosäurentestmischungen auf die Säulen wurde die Stellung der einzelnen Aminosäurenspitzen im Eluat bestimmt und gleichzeitig die Leistungsfähigkeit der Methode bezüglich Trennschärfe und Genauigkeit geprüft. Aus Abb. 5, die das Chromatogramm einer solchen Testmischung zeigt, geht die vorzügliche Trennung der einzelnen Aminosäuren deutlich hervor. Die Reihenfolge derselben stimmt mit den Angaben der Literatur überein.

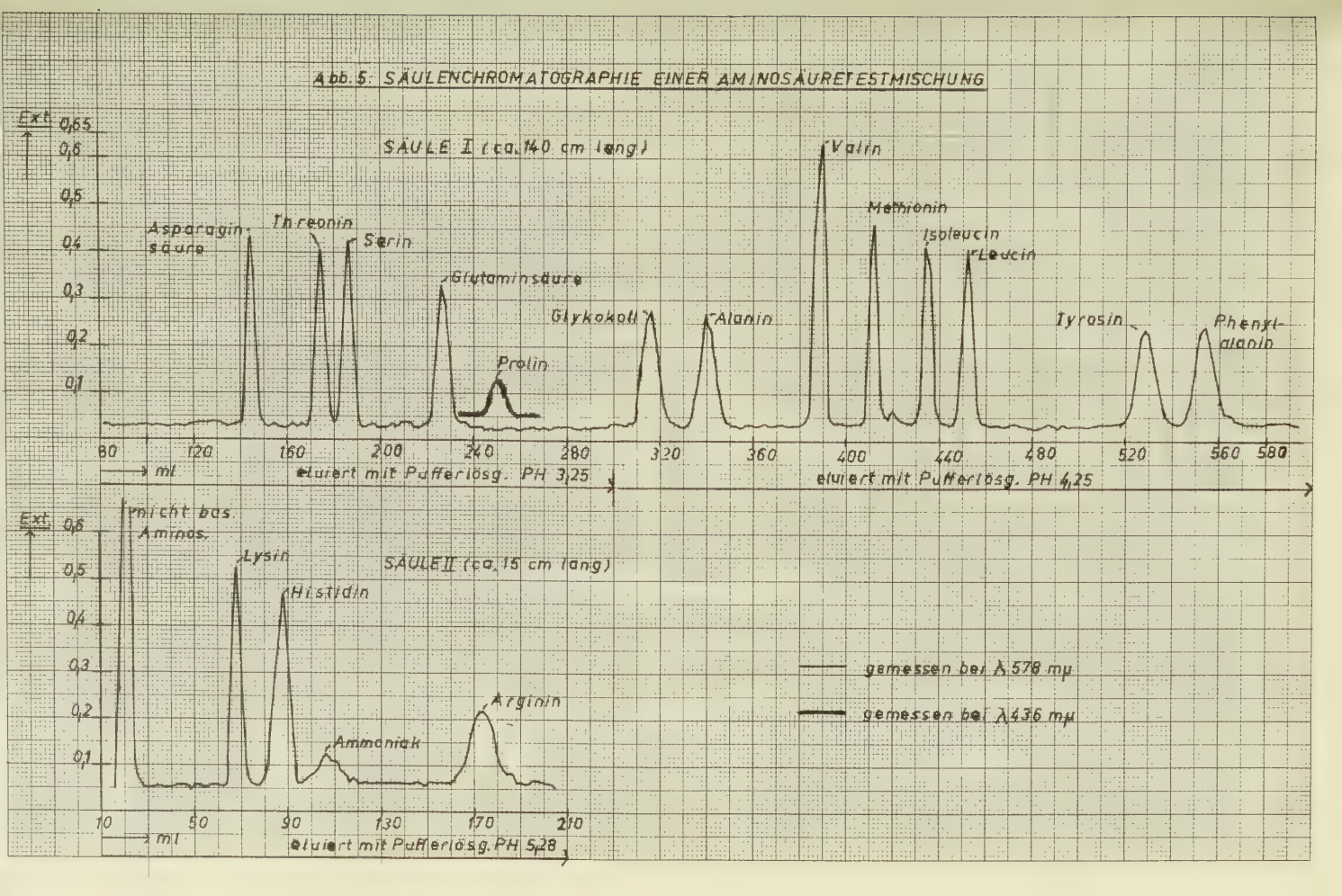
Die quantitativen Ergebnisse einiger solcher Testanalysen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Aminosäurentrennung von Aminosäurentestmischungen

Wiedergefundene Aminosäuren in %

	1.	2.	3.	Mittelwert
Alanin	103,0	94,5	99,9	99,1
Arginin	104,7	96,1	94,3	98,4
Asparaginsäure	91,8	92,9	96,8	93,8
Glutaminsäure	101,8	106,2	93,2	100,4
Glycin	92,3	93,5	104,5	96,8
Histidin	84,8	82,8	85,2	84,3
Isoleucin	89,8	96,8	92,4	93,0
Leucin	89,7	95,5	98,2	94,5
Lysin	99,2	100,6	100,1	99,8
Methionin	96,0	92,8	98,8	95,9
Phenylalanin	102,1	93,9	100,2	98,7
Prolin	103,2	88,8	110,5	100,8
Serin	103,3	101,1	96,8	100,4
Threonin	99,8	91,8	95,6	95,7
Tyrosin	93,5	96,2	101,3	97,0
Valin	112,1	115,2	110,3	112,4

Abb. 5: SÄULENCHROMATOGRAPHIE EINER AMINOSÄURETESTMISCHUNG



Hieraus ergibt sich, daß die Abweichungen vom theoretischen Wert meist unter 10 % liegen, entsprechend den Angaben des Schrifttums. Nur bei Valin und Histidin sind die Unterschiede größer, was seinen Grund darin hat, daß diese beiden Substanzen nicht in der Qualität p.a. "chromatographisch rein" zur Verfügung standen.

Die gelegentliche Überprüfung der Säulen mit solchen Testgemischen während der Versuchszeit zeigte, daß die Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren mit der gleichen Amberlite-Füllung selbst nach zahlreichen Analysen noch einwandfrei gelang. Diejenige der basischen Aminosäuren auf den kleinen Säulen war bei Verwendung huminarmer Hydrolysate ebenfalls lange Zeit quantitativ durchführbar, jedoch können Verunreinigungen der Füllung durch stärker huminhaltige Hydrolysate zu einer Retention der basischen Aminosäuren führen, weshalb hier eine häufigere Prüfung und eventuelle Neufüllung empfehlenswert erscheint.

5. Die Bestimmung des Cystins

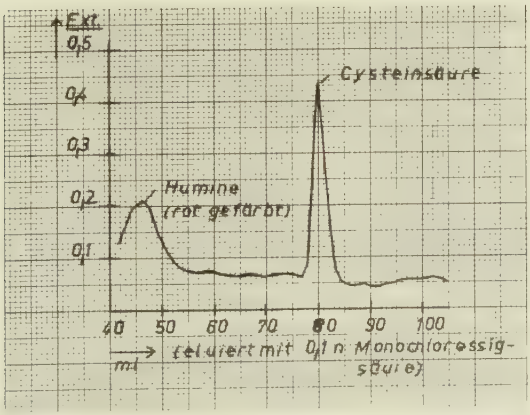
Da Cystin bezw. Cystein, wie bereits erwähnt, auch bei schonendster Durchführung der Hydrolyse zerstört wird, mußte zu seiner Bestimmung ein besonderer Weg gefunden werden. Es wurden deshalb einige der in der Literatur beschriebenen Methoden erprobt, so z.B. diejenige nach S u l l i v a n und H e s s (26), sowie jene nach F u j i t a und N u m a t a (27). Diese Methoden bewährten sich bei reinen Cystinlösungen und auch noch bei reinem Eiweiß. Für das angestrebte Ziel einer Cystinbestimmung unmittelbar im grünen Kaffee waren sie jedoch nicht geeignet. Versuche, Cystin während der Hydrolyse durch Maskierung mit p-Chlormercuribenzoesäure zu schützen, schlugen fehl, weil diese auch im Überschuß nicht stöchiometrisch mit Cystin reagierte.

Eine von S c h r a m m , M o o r e und B i g w o o d beschriebene Methode (28) erwies sich zwar anfangs ebenfalls nicht als geeignet, konnte aber in einer für die eigenen Zwekke brauchbaren Weise modifiziert werden. Bei dieser Methode werden Cystin bezw. Cystein vor der Hydrolyse durch Perameisensäure zu Cysteinsäure oxydiert, welch letztere die Hydro-

lyse ohne wesentlichen Verluste übersteht. Durch eine der Hydrolyse folgende säulenchromatographische Behandlung läßt sich die Cysteinsäure dann abtrennen und gesondert bestimmen.

Bei der Erprobung der Methode ergab sich, daß die Verwendung eines Rotationsverdampfers, der von den Autoren zur schonenden Entfernung der Perameisensäure empfohlen wird, zu Korrosionserscheinungen im Metallkern des Verdampfers führte. Es wurde deshalb in der Folge die Perameisensäure durch einfache Vakuumdestillation entfernt, was völlig befriedigende Ergebnisse zeitigte. Bei Einsatz der vorgeschriebenen 15 cm langen Anionenaustauschersäule mit dem Harz Dowex 2 x 10, 200 - 400 mesh, war die Tropfgeschwindigkeit der Säule aber so groß, daß die Trennung sehr unscharf wurde. Schließlich konnte durch eine Verlängerung der Säule auf 80 cm eine saubere Trennung der Cysteinsäure von den anderen Aminosäuren des Hydrolysates und vor allem von den Huminen erzielt werden. (siehe Abb. 6).

Abb. 6: Säulenchromatographische Abtrennung der Cysteinsäure aus einem Rohkaffee - Hydrolysat



Auf Grund der Untersuchungen ergab sich dann folgende Arbeitsvorschrift:

A r b e i t s v o r s c h r i f t

a) Geräte und Reagentien:

Eine 90 cm lange Säule ohne Wassermantel mit 0,9 cm innerem Durchmesser, die 80 cm hoch mit Austauscherharz gefüllt und mit 0,1 n-Monochloressigsäure beladen wird.

Anionenaustauscherharz Dowex 2 x 10, 200 - 400 mesh

0,1 n-Monochloressigsäurelösung

Ameisensäure 98 - 100 % p.a.

Perhydrol p.a.

6 n-Salzsäure: Salzsäure p.a. (d = 1,19) wird wie oben beschrieben destilliert und das Destillat mit dem Aräometer auf 6 n-Salzsäure eingestellt.

Natriumcitratpuffer: 0,5 n-Citronensäurelösung in 2 n-Natronlauge

Ninhydrinreagenz wie bei der Bestimmung der Aminosäuren beschrieben.

b) Bestimmung des Cystins:

9 ml Ameisensäure p.a. werden mit 1 ml Perhydrol p.a. gemischt und nach 1 Stunde zu 500 mg feingemahlenem Rohkaffee zugesetzt. Diese Mischung läßt man unter gelegentlichem Umrühren 2 Stunden bei Zimmertemperatur reagieren. Anschließend wird sie mit 200 ml Wasser quantitativ in einen 500 ml Rundkolben gespült und im Vakuum bis auf 10 ml eingedampft. Dann versetzt man mit 400 ml destillierter 6 n-Salzsäure und hydrolysiert den Ansatz wie oben beschrieben unter Rückfluß 22 Stunden im Glycerinbad. Nach dieser Zeit wird die Salzsäure im Vakuum wiederum bis auf ca. 10 ml abdestilliert und der Rückstand nach Filtration in einen 100 ml Meßkolben übergeführt. Die aufgefüllte Analysenlösung soll annähernd einer 1 n-Säure entsprechen. Zu stark saure Lösungen führen zur Beschleunigung, zu schwach saure zur Verlangsamung der Cysteinsäure-Eluierung. Die Lösung wird mit Thymol versetzt und kühl aufbewahrt.

Die Säulenchromatographie soll möglichst schon am nächsten

Tag durchgeführt werden. Hierzu wird die Säule mit 2 ml des Hydrolysates beschickt und mit 0,1 n-Monochloressigsäure bei Zimmertemperatur eluiert. Die Auslaufgeschwindigkeit soll etwa 15 ml pro Stunde betragen. Das Eluat wird in Fraktionen von 2 ml gesammelt. Die Cysteinsäure tritt nach Durchlauf aller anderen Aminosäuren und der Humine etwa bei der 40. Fraktion als scharfe Spitze auf (siehe Abb. 6). Nach 50 Fraktionen kann die Eluierung abgebrochen werden, was nach etwa 7 Stunden der Fall ist. Zur Erreichung des richtigen pH-Wertes für die Ninhydrinreaktion müssen die stärker sauren Fraktionen dieser Säule vor der weiteren Behandlung mit je 3 Tropfen des Natriumcitratpuffers versetzt werden.

Die weitere Bestimmung der Cysteinsäure in den einzelnen Fraktionen geschieht wie bei den Aminosäuren. Die zusammengezählten Extinktionswerte der Cysteinsäure werden mit einem durch Eichmessungen ermitteltem Faktor auf Cysteinsäure, bezw. auf Cystin umgerechnet. Da nach den Beobachtungen von S c h r a m m, M o o r e und B i g w o o d (28) und nach eigenen Untersuchungen jedoch immer nur ca. 90 % des Cystins in Cysteinsäure umgeformt werden, müssen zum gefundenen Ergebnis noch 10 % zugezählt werden. Die Methode wurde an reinstem krist. ß-Lactoglobulin geprüft und die gefundenen Cystinwerte stimmten innerhalb 10 % mit dem Literaturwert überein.

In der Eiweißforschung werden mit Perameisensäure vorbehandelte Hydrolysate häufig auch zur Gesamtaminosäurenbestimmung herangezogen. Unsere so erhaltenen Kaffee-Hydrolysate waren jedoch hierzu nicht geeignet. So fanden wir bei der Säulentrennung eines solchen Hydrolysates, daß Methylamin als Spaltprodukt des Coffeins bei der Trennung der basischen Aminosäuren störend in Erscheinung trat. Außerdem wurden Tyrosin und Phenylalanin durch die aggressive Perameisensäure zerstört und konnten nicht mehr gemessen werden. Ihre Bestimmung erscheint nur möglich, wenn die Perameisensäurebehandlung bei $0^{\circ}C$ durchgeführt wird und die Entfernung der Perameisensäure durch Gefriertrocknung geschieht, wofür zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht die nötigen Apparaturen vorhanden waren.

6. Die Bestimmung des Tryptophans.

Die Ermittlung des Tryptophans war, wie schon erwähnt, ebenfalls auf beträchtliche Schwierigkeiten gestoßen. Wie das Cystin wird auch das Tryptophan durch Hydrolyse besonders in Gegenwart von Kohlenhydraten weitgehend zerstört. Die von S p i e s und C h a m b e r s (14, 15) vorgeschlagene Methode, welche die Tryptophanbestimmung aus dem nicht hydrolysiertem Eiweiß selbst in Gegenwart von Kohlenhydraten vornimmt, erwies sich als nicht durchführbar, da die Chlorogensäure des Rohkaffees mit dem Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) eine ähnliche Violettfärbung liefert wie das Tryptophan. Es blieb daher nichts anderes übrig, als eine Fraktion des Gesamtproteins chlorogensäurefrei zu isolieren, in dieser das Tryptophan zu ermitteln und die nach der Hydrolyse festgestellte Zusammensetzung dieses Eiweißanteils mit derjenigen des Gesamtproteins zu vergleichen. Wie schon dargelegt wurde, stimmte der Aufbau dieser Proteinfraktion so weitgehend mit derjenigen des Gesamteiweisses überein, daß der Tryptophangehalt dieser Proteinfraktion als repräsentativ für das Gesamteiweiß betrachtet werden kann. Die Extraktion des Rohkaffees wurde mit Wasser vorgenommen, so daß die hieraus gewonnene Proteinfraktion als Albumin zu bezeichnen ist.

Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß etwa 50 g entfettetes Kaffeemehl der Probe F mit 400 ml Wasser von 20°C 6 Stunden geschüttelt und nach dem Absetzen über Kieselgur filtriert wurden. Trotz mehrfacher Wiederholung des Filtrationsprozesses konnte das kolloidal getrübte Filtrat nicht geklärt werden. Nach Zusatz von 4 ml konz. Salzsäure trat sofortige käsige Ausflokkung ein. Diese wurde durch mehrmaliges Auswaschen mit 96 % Alkohol und Zentrifugieren gereinigt und im Vakuumexsikkator getrocknet. Die Auswaage des Trockenextraktes betrug 0,554 g. Eine hiermit durchgeführte Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 11,8 % Stickstoff. Dieser Wert deutet nach Multiplikation mit 6,25 auf einen Reinalbumingehalt von 73,8 % im Trockenextrakt. Chlorogensäure konnte darin nicht nachgewiesen werden. Es wurde deshalb mit diesem eine Tryptophanbestimmung nach S p i e s und C h a m b e r s durchgeführt und ein Trypto-

phangehalt von 1,47 %, bezogen auf Reinalbumin, ermittelt.

Da sich die Tryptophanbestimmung auf diesem Wege als ziemlich umständlich erwies und die gefundenen Resultate doch nur Annäherungswerte sein können, wurde diese Art der Bestimmung aus extrahiertem Eiweiß auf die Probe 5 beschränkt.

D. Zusammenfassung.

Bei 5 Proben Arabica-, 2 Proben Robusta- und einer Probe Liberica-Kaffee, deren Herkunft und Wachstumsbedingungen genau bekannt waren, wurde die Aminosäurenzusammensetzung des Gesamteiweisses untersucht. Trotzdem die Proben verschiedenen und unter sehr wechselnden Klimaverhältnissen (Brasilien, Ostafrika und westafrikanische Insel Fernando Poo) gewachsenen Coffea-Arten angehörten, schwankte der Eiweißgehalt nur in sehr geringen Grenzen zwischen 8,7 % und 9,7 %. Die Zusammensetzung der Proteine war überraschend gleichförmig. Als Hauptbestandteil erwies sich Glutaminsäure, die etwa 19 % des Eiweisses ausmachte. Die Unterschiede im Gehalt an den einzelnen Aminosäuren waren bei den 8 untersuchten Kaffeeproben so gering, daß sie eher auf irgendwelche Zufälligkeiten als auf bezeichnende Sortenverschiedenheiten zurückzugehen scheinen.

Deutliche Artunterschiede zeigten sich im Gehalt an Trigonellin, wovon Coffea arabica etwa 1,0 - 1,2 %, Coffea robusta 0,5 - 0,7 % und Coffea liberica ca. 0,25 % enthielten. Insgesamt wurde bei 5 verschiedenen Libericaproben ein gleich niedriger Trigonellingehalt gefunden, so daß dieser tatsächlich eine Arteigentümlichkeit des Libericakaffees zu sein scheint.

Die Ergebnisse sind insofern von Interesse, als man bisher zum Teil der Ansicht war, daß die sehr beträchtlichen Unterschiede im Geschmack und Aroma verschiedener Arabicakaffees (harte, weiche und neutrale Kaffees) wenigstens teilweise auf einem wechselnden Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren und an Trigonellin beruhten, welch letzteres beim Erhitzen Pyridin liefern kann. Durch diese Untersuchungen wurde gezeigt, daß das Problem der Aromabildung tiefer liegen muß und nicht so einfach gedeutet werden kann.

Die Untersuchung der Aminosäurenzusammensetzung des Gesamteiweisses geschah nach den säulenchromatographischen Verfahren von Moore, Spackman und Stein.

Für die Bestimmung der Aminosäuren Cystin und Tryptophan, die bei der Hydrolyse weitgehend zerstört werden, mußten andere Methoden gefunden werden.

Zur Bestimmung von Cystin erwies sich das Verfahren von Schramm, Moore und Bigwood nach einigen Abänderungen als recht gut verwendbar.

Die Ermittlung des Tryptophans stieß jedoch auf Schwierigkeiten, weil die im Kaffee enthaltene Chlorogensäure mit dem Reagenz p-Dimethylaminobenzaldehyd der in Betracht kommenden Methode nach Spies und Chambers ähnliche Färbungen lieferte wie das Tryptophan und die Chlorogensäure sich vom Gesamtprotein nicht abtrennen ließ. Es wurde deshalb eine chlorogensäurefreie Albuminfraktion isoliert und in dieser das Tryptophan bestimmt. Da die Aminosäurenzusammensetzung dieses Albumins mit derjenigen des Gesamtproteins übereinstimmte, konnte der Tryptophangehalt des Albumins als repräsentativ für denjenigen des Gesamtproteins angesehen werden.

E. Literaturverzeichnis

1) Hughes E.B. und Smith R.R.: J. Soc. chem. Ind. (London) 68, 322 (1949)

2) Barbera C.E.: Coffee and Tea Ind. 79, 12 (1956)

3) Bernheimer O.: Monatsh. f. Chemie 1, 456 (1880)

4) Rothe M. und Thomas B.: Die Nahrung 3, 1 (1959)

5) Underwood D.E. und Deatherage F.E.: Food Research 17, 425 (1952)

6) Ciupka P.: Kaffee, Kaffee-Ersatz und Kaffee-Zusatz Otto Meissners Verlag, Schloß Bleckede a.d. Elbe

7) Kogan L., DiCarlo F.J. und Maynard W.E.: Analyt. Chem. 25, 1118 (1959)

8) Lockhart E.E.: Chemistry of coffee, The Coffee Brewing Institute I.N.C., New-York.

9) Hadorn H. und Suter H.: Mitt. Lebensmitt.-Untersuchung Hyg. 47, 33 (1956)

10) Slotta K.H. und Neisser K.: Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 126 (1939)

11) Moores R.G. und Greninger D.M.: Analyt. Chem. 23, 327 (1951)

12) Nottbohm F.E. und Mayer F.: Z. Unters. Lebensmitt. 61, 429, (1931)

13) Moore S., Spackman D.H. und Stein W.H.: Analyt. Chem. 30, 1190 (1958)

14) Spies J. und Chambers D.C.: Analyt. Chem. 20, 30 (1948)

15) Spies J. und Chambers D.C.: Analyt. Chem. 21, 1249 (1949)

16) Segall St. und Proctor B.E.: Food Technol. 13, 266, 383 und 679 (1959)

17) Beythien A. und Diemair W.: Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker, 7. Aufl. S. 513, Dresden und Leipzig: Theodor Steinkopff 1957

18) Kofrányi E.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 287, 170 (1951)

19) Krampitz G.: Z. Tierernährung und Futtermittelk. 15, 227 (1960)

20) Dustin J.P., Czajkowska C., Moore S. und Bigwood E.: Analyt. chim. Acta 9, 256 (1953)

21) Moore S. und Stein W.H.: J. biol. Chem. 192, 663 (1951)

22) Moore S. und Stein W.H.: J. biol. Chem. 211, 893 (1954)

23) Schormüller J., Belitz H.D. und Adler G.: Z. Lebensmitt.-Unters. 109, 129 (1959)

24) Yemm E.W. und Cocking E.C.: The Analyst 80, 209 (1955)

25) Moore S. und Stein W.H.: J. biol. chem. 211, 907 (1954)

26) Sullivan M.X. und Hess W.C.: J. biol. chem. 117, 423 (1937)

27) Fujita A. und Numata J.: Biochem. Z. 300, 264 (1938/39)

28) Schramm E., Moore S. und Bigwood E.: Biochem. J. 57, 33 (1954)

Anhang

Tabelle I: Analysenbilanz NACIONAL I

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,23 % i.T.	Protein = 9,50 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0706	0,0742	4,88	4,97	4,9
Arginin	0,1559	0,1505	5,26	4,93	5,1
Asparaginsäure	0,0972	0,0986	9,99	9,87	9,9
Cystin	0,0448	0,0448	4,12	4,11	4,1
Glutaminsäure	0,1713	0,1791	19,55	19,85	19,7
Glycin	0,1105	0,1180	6,42	6,66	6,5
Histidin	0,0550	0,0656	2,20	2,55	2,4
Isoleucin	0,0401	0,0438	4,07	4,32	4,2
Leucin	0,0936	0,0941	9,50	9,28	9,4
Lysin	0,1164	0,1168	6,57	6,40	6,5
Methionin	0,0217	0,0224	2,51	2,52	2,5
Phenylalanin	0,0447	0,0383	5,70	4,75	5,2
Prolin	0,0576	0,0709	5,15	6,13	5,6
Serin	0,0670	0,0576	5,43	4,55	5,0
Threonin	0,0498	0,0445	4,60	3,99	4,3
Tyrosin	0,0333	0,0288	4,67	3,93	4,3
Valin	0,0674	0,0677	6,10	5,96	6,0
Ammoniak	0,1793	0,2040	2,36	2,61	2,5
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,4762	1,5197			
Coffein	0,3030	0,3030		1,05 % i.T.	
Trigonellin	0,1050	0,1050		1,03 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,8842	1,9277			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	1,9000	1,9000			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	99,3 %	101,4 %			

Tabelle II: Analysenbilanz NACIONAL II

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,03 % i.T.	Protein = 9,03 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0678	0,0655	4,76	4,62	4,7
Arginin	0,1031	0,1100	3,56	3,79	3,7
Asparaginsäure	0,1052	0,0956	11,03	10,02	10,5
Cystin	0,0437	0,0437	4,23	4,05	4,1
Glutaminsäure	0,1805	0,1752	21,02	20, 40	20, 7
Glycin	0,1109	0,1099	6,58	6,52	6,5
Histidin	0,0705	0,0774	2,88	3,14	3,0
Isoleucin	0,0392	0,0364	4,00	3,78	3,9
Leucin	0,0899	0,0876	9,34	9,08	9,2
Lysin	0,1112	0,1187	6,43	6,86	6,6
Methionin	0,0190	0,0110	2,24	1,29	1,8
Phenylalanin	0,0403	0,0415	5,25	5,42	5,3
Prolin	0,0764	0,0756	6,96	6,88	6,9
Serin	0,0811	0,0838	6,73	6,96	6,8
Threonin	0,0505	0,0494	4,77	4,66	4,7
Tyrosin	0,0292	0,0278	4,18	3,99	4,1
Valin	0,0646	0,0613	5,98	5,68	5,8
Ammoniak	0,1611	0,1750	2,17	2,36	2,3
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,4442	1,4454			
Coffein	0,2990	0,2990		1,04 % i.T.	
Trigonellin	0,1058	0,1058		1,03 %i. T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,8490	1,8502			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	1,8180	1,8180			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	101,7 %	101,8 %			

Tabelle III: Analysenbilanz NACIONAL III

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäuren-stickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,22 % i.T.	Protein = 9,20 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0722	0,0784	4,97	5,42	5,2
Arginin	0,1625	0,1589	5,49	5,38	5,4
Asparaginsäure	0,0994	0,0981	10,22	10,12	10,2
Cystin	0,0472	0,0472	4,65	4,12	4,4
Glutaminsäure	0,1608	0,1644	18,30	18,79	18,5
Glycin	0,1203	0,1172	6,98	6,83	6,9
Histidin	0,0726	0,0741	2,91	2,97	2,9
Isoleucin	0,0404	0,0321	4,10	3,27	3,7
Leucin	0,0867	0,0854	8,80	8,69	8,7
Lysin	0,1103	0,1109	6,24	6,30	6,3
Methionin	0,0322	0,0172	3,72	1,99	2,9
Phenylalanin	0,0471	0,0521	6,00	6,65	6,3
Prolin	0,0594	0,0786	5,29	7,03	6,2
Serin	0,0723	0,0710	5,88	5,78	5,8
Threonin	0,0454	0,0436	4,18	4,03	4,1
Tyrosin	0,0285	0,0298	3,99	4,05	4,0
Valin	0,0585	0,0561	5,31	5,11	5,2
Ammoniak	0,1580	0,1552	2,08	2,05	2,1
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,4738	1,4703			
Coffein	0,3210	0,3210		1,11 % i.T.	
Trigonellin	0,1051	0,1051		1,03 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,8999	1,8964			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	1,8700	1,8700			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	101,7 %	101,4 %			

Tabelle IV: Analysenbilanz BOURBON

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 8,70 % i.T.	Protein = 8,72 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0623	0,0691	4,56	5,03	4,8
Arginin	0,1680	0,1711	6,02	6,13	6,1
Asparaginsäure	0,0887	0,0889	9,69	9,70	9,7
Cystin	0,0503	0,0503	5,05	4,88	5,0
Glutaminsäure	0,1534	0,1468	18,60	17,72	18,2
Glycin	0,1131	0,1130	6,98	6,94	7,0
Histidin	0,0485	0,0561	2,04	2,37	2,2
Isoleucin	0,0338	0,0450	3,63	4,83	4,2
Leucin	0,0814	0,0866	8,76	9,30	9,0
Lysin	0,1009	0,0981	6,03	5,86	5,9
Methionin	0,0147	0,0196	1,81	2,39	2,1
Phenylalanin	0,0394	0,0418	5,34	5,64	5,5
Prolin	0,0557	0,0635	5,27	5,99	5,6
Serin	0,0755	0,0707	6,51	6,08	6,3
Threonin	0,0406	0,0393	3,98	3,84	3,9
Tyrosin°	0,0258	0,0279	3,84	4,14	4,0
Valin	0,0705	0,0526	6,78	5,03	5,9
Ammoniak	0,1688	0,1560	2,36	2,18	2,3
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,3914	1,3964			
Coffein	0,2700	0,2700		0,90 % i.T.	
Trigonellin	0,1229	0,1229		1,20 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,7843	1,7893			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	1,7750	1,7750			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	100,5 %	100,8 %			

Tabelle V: Analysenbilanz COMMUN

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,60 % i.T.	Protein = 9,53 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0765	0,0729	5,06	4,86	5,0
Arginin	0,1728	0,1714	5,58	5,56	5,6
Asparaginsäure	0,0988	0,1031	9,77	10,27	10,0
Cystin	0,0475	0,0475	4,03	4,47	4,2
Glutaminsäure	0,1746	0,1733	19,18	19,13	19,2
Glycin	0,1128	0,1160	6,28	6,51	6,4
Histidin	0,0640	0,0629	2,46	2,43	2,4
Isoleucin	0,0404	0,0365	3,94	3,58	3,8
Leucin	0,1053	0,0962	10,25	9,43	9,8
Lysin	0,1193	0,1228	6,22	6,71	6,5
Methionin	0,0200	0,0228	2,22	2,54	2,4
Phenylalanin	0,0540	0,0532	6,61	6,56	6,6
Prolin	0,0703	0,0778	6,02	6,71	6,3
Serin	0,0619	0,0715	4,83	5,62	5,2
Threonin	0,0408	0,0391	3,62	3,49	3,6
Tyrosin	0,0392	0,0327	5,28	4,43	4,9
Valin	0,0582	0,0545	5,08	4,78	4,9
Ammoniak	0,1775	0,1718	2,25	2,19	2,2
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,5339	1,5260			
Coffein	0,3090	0,3090		1,07 % i.T.	
Trigonellin	0,1132	0,1132		1,10 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,9561	1,9482			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	1,8720	1,8720			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	104,4 %	104,0 %			

Tabelle VI: Analysenbilanz ROBUSTA I

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,15 % i.T.	Protein = 9,33 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0936	0,0826	6,50	5,63	6,1
Arginin	0,1290	0,1432	4,41	4,77	4,6
Asparaginsäure	0,1040	0,1038	10,79	10,76	10,8
Cystin	0,0410	0,0410	3,86	3,74	3,8
Glutaminsäure	0,1460	0,1590	16,77	17,90	17,3
Glycin	0,1418	0,1331	8,30	7,64	8,0
Histidin	0,0618	0,0604	2,49	2,39	2,4
Isoleucin	0,0393	0,0379	4,03	3,81	3,9
Leucin	0,0882	0,0888	9,01	8,90	9,0
Lysin	0,1045	0,1125	5,95	6,29	6,1
Methionin	0,0224	0,0149	2,61	1,69	2,2
Phenylalanin	0,0451	0,0399	5,81	5,03	5,4
Prolin	0,0727	0,0759	6,57	6,70	6,6
Serin	0,0707	0,0746	5,80	5,99	5,9
Threonin	0,0419	0,0465	3,90	4,24	4,1
Tyrosin	0,0317	0,0329	4,48	4,55	4,5
Valin	0,0507	0,0586	4,64	5,25	4,9
Ammoniak	0,1782	0,1860	2,37	2,42	2,4
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,4626	1,4916			
Coffein	0,4460	0,4460		1,55 % i.T.	
Trigonellin	0,0730	0,0730		0,71 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,9816	2,0106			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	2,1350	2,1350			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	92,8 %	94,3 %			

Tabelle VII: Analysenbilanz ROBUSTA II

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,54 % i.T.	Protein = 9,85 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0782	0,0704	5,18	4,53	4,9
Arginin	0,1300	0,1890	4,24	5,97	5,1
Asparaginsäure	0,1193	0,1089	11,80	10,50	11,2
Cystin	0,0402	0,0402	3,53	3,60	3,6
Glutaminsäure	0,1722	0,1698	19,00	18,12	18,6
Glycin	0,1302	0,1269	7,29	6,91	7,1
Histidin	0,0726	0,0865	2,81	3,24	3,0
Isoleucin	0,0365	0,0344	3,59	3,27	3,4
Leucin	0,0891	0,0850	8,74	8,09	8,4
Lysin	0,1140	0,1156	6,23	6,13	6,2
Methionin	0,0118	0,0127	1,32	1,37	1,3
Phenylalanin	0,0421	0,0430	5,20	5,15	5,2
Prolin	0,0814	0,0758	7,02	6,34	6,7
Serin	0,0798	0,0784	6,28	5,96	6,1
Threonin	0,0497	0,0435	4,43	3,92	4,2
Tyrosin	0,0330	0,0347	4,46	4,54	4,5
Valin	0,0612	0,0604	5,38	5,11	5,2
Ammoniak	0,1835	0,1990	2,34	2,46	2,4
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,5248	1,5742			
Coffein	0,4630	0,4630		1,60 % i.T.	
Trigonellin	0,0656	0,0656		0,64 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	2,0534	2,1028			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	2,2100	2,2100			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	92,8 %	95,2 %			

Tabelle VIII: Analysenbilanz LIBERICA

Untersuchte Stickstoffverbindungen	Stickstoffgehalt in % der Trockenmasse		Aminosäuren in % des Proteins (Protein = Aminosäurenstickstoff x 6,25)		
			Protein = 9,06 % i.T.	Protein = 8,90 % i.T.	
	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	1.Hydrolysat	2.Hydrolysat	Mittelwerte
Alanin	0,0800	0,0798	5,61	5,70	5,7
Arginin	0,0934	0,0936	3,20	3,27	3,2
Asparaginsäure	0,1044	0,0978	10,92	10,47	10,7
Cystin	0,0406	0,0406	3,69	4,07	3,9
Glutaminsäure	0,1771	0,1684	20,55	19,90	20,2
Glycin	0,1194	0,1200	7,08	7,24	7,2
Histidin	0,0580	0,0574	2,36	2,38	2,4
Isoleucin	0,0400	0,0409	4,13	4,30	4,2
Leucin	0,0814	0,0778	8,40	8,19	8,3
Lysin	0,1028	0,1338	5,91	7,95	6,9
Methionin	0,0206	0,0123	2,42	1,53	2,0
Phenylalanin	0,0503	0,0561	6,53	7,42	7,0
Prolin	0,0678	0,0727	6,15	6,73	6,4
Serin	0,0684	0,0719	5,67	6,05	5,9
Threonin	0,0467	0,0468	4,39	4,41	4,4
Tyrosin	0,0407	0,0357	5,80	5,18	5,5
Valin	0,0717	0,0723	6,63	6,78	6,7
Ammoniak	0,1860	0,1456	2,49	1,98	2,2
Stickstoffsumme der Aminosäuren	1,4493	1,4234			
Coffein	0,3500	0,3500		1,21 % i.T.	
Trigonellin	0,0270	0,0270		0,26 % i.T.	
Gesamtstickstoffsumme	1,8263	1,8004			
Kjeldahl-Gesamtstickstoff	1,8620	1,8620			
Stickstoffsumme in % vom Kjeldahlstickstoff	98,2 %	96,8 %			

Lebenslauf

Am 30. September 1925 wurde ich als Sohn des prakt. Arztes Dr. Otto Gaigl und seiner Ehefrau Marianne, geb. Ackermann in Waldkirch/Breisgau geboren.

Von 1932 bis 1936 besuchte ich die Volksschule und von 1936 bis 1941 die Realschule in Waldkirch. Von 1941 bis zu meiner Einberufung im Juni 1943 war ich Schüler des Realgymnasiums in Freiburg/Breisgau, das ich mit dem Reifevermerk verließ.

Nach einer kurzen Dienstzeit im Reichsarbeitsdienst wurde ich Ende September 1943 zur Wehrmacht einberufen. Anfang Mai 1945 geriet ich in Böhmen als Angehöriger der Kriegsschule Milowitz in russische Kriegsgefangenschaft. Die Zeit der Gefangenschaft verbrachte ich hauptsächlich in Tkwibuli (Transkaukasien).

Nach meiner Heimkehr Anfang November 1949 nahm ich von November 1949 bis Oktober 1950 an einem Sonderkurs für Kriegsteilnehmer am Rotteck-Gymnasium in Freiburg/Breisgau teil, nach welcher Zeit ich dort die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend erhielt ich an der Stadtapotheke in Pfullendorf/Kreis Überlingen eine zweijährige Praktikantenausbildung, die ich mit der pharmazeutischen Vorprüfung abschloß.

Im Wintersemester 1952 begann ich mit dem Studium der Pharmazie an der Universität Freiburg. Nach 6 Semestern bestand ich dort das pharmazeutische Staatsexamen.

An die Pharmazie schloß sich ab Mai 1956 an der Technischen Hochschule Karlsruhe das Studium der Lebensmittelchemie an, wobei ich gleichzeitig Praktikant an der Staatl. Lebensmitteluntersuchungsanstalt in Karlsruhe war. Im Dezember 1957 legte ich in Karlsruhe das Staatsexamen als Lebensmittelchemiker ab.

Im Mai 1958 begann ich dann an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München mit vorliegender Arbeit.